Band II Heft 1 – 5 Oktober 1912

Zeitschrift für Gärungsphysiologie

allgemeine, landwirtschaftliche und technische Mykologie

unter Mitwirkung von

V. Babes-Bukarest, **Chr. Barthel**-Stockholm, **A. Bau**-Bremen, **M. W. Beijerinck**-Delft, **W. Benecke**-Berlin, **Ph. Biourge**-Löwen, **A. J. Brown**-Birmingham, **M. Bücheler**-Weihenstephan, **R. Burri**-Liebefeld bei Bern, **A. Calmette**-Lille, **R. Chodat**-Genf, **A. Cluss**-Wien, **F. Czapek**-Prag, **M. Düggeli**-Zürich, **J. Effront**-Brüssel, **F. Ehrlich**-Breslau, **H. v. Euler**-Stockholm, **A. Fischer**-Basel, **C. Gorini**-Mailand, **R. Graßberger**-Wien, **A. Harden**-London, **H. A. Harding**-New York, **F. C. Harrison**-Ste. Anne de Bellevue, Canada, **F. v. Höhnel**-Wien, **J. Chr. Holm**-Kopenhagen, **F. Hueppe**-Prag, **G. v. Istvánffi**-Budapest, **Orla Jensen**-Kopenhagen, **Alfred Jörgensen**-Kopenhagen, **V. v. Klecki**-Krakau, **M. Klimmer**-Dresden, **A. Koch**-Göttingen, **R. Kolkwitz**-Steglitz-Berlin, **F. Krasser**-Prag, **W. Kruse**-Bonn, **H. van Laer**-Gent, **F. Löhnis**-Leipzig, **Ch. E. Marshall**-East Lansing, Michigan, **R. Meißner**-Weinsberg, **W. Migula**-Eisenach, **H. Molisch**-Wien, **C. Neuberg**-Berlin, **W. Palladin**-Petersburg, **P. Petit**-Nancy, **P. Pichi**-Conegliano, **E. Prior**-Wien, **O. Richter**-Wien, **E. Roux**-Paris, **K. Saito**-Tokio, **A. Schattenfroh**-Wien, **W. Seifert**-Klosterneuburg, **J. Stoklasa**-Prag, Freiherr **v. Tubeuf**-München, **W. Winkler**-Wien, **J. Wortmann**-Geisenheim, **H. Zikes**-Wien

herausgegeben von

Professor Dr. Alexander Kossowicz-Wien

BERLIN
Verlag von Gebrüder Borntraeger
W 35 Schöneberger Ufer 12a
1912

Inhalt des 1. Heftes

Die „Zeitschrift für Gärungsphysiologie" erscheint in zwanglosen Heften von je ca. 4 Bogen. Je 24 Druckbogen bilden einen Band zum Preise von 20 Mark. Jährlich gelangen $1^1/_2$ bis 2 Bände zur Ausgabe.

Alle die **Redaktion** betreffenden Zuschriften und Sendungen (Manuskripte, Separatabdrücke, Rezensionsexemplare) sind an den Herausgeber **Professor Dr. Alexander Kossowicz, Wien II, Josef-Gall-Gasse 2,** zu richten, alle geschäftlichen Mitteilungen an die **Verlagsbuchhandlung Gebrüder Borntraeger in Berlin W 35, Schöneberger Ufer 12a.**

Originalabhandlungen können auch in **englischer, französischer und italienischer Sprache** zur Veröffentlichung gelangen.

Bereits in anderen Zeitschriften veröffentlichte Originalabhandlungen werden nicht aufgenommen.

Über Silikatzersetzung durch Bodenbakterien.

I. Mitteilung.

Von **Kasimir Bassalik.**

(Aus dem botanischen Institut der Universität Basel. Vorstand: Prof. Dr. A. Fischer.)

I. Über die Tätigkeit der Regenwürmer in Beziehung zu den Bodenbakterien.

1. Mechanische Bodenzerkleinerung durch Regenwürmer.

Die Fruchtbarkeit des Bodens sucht man in neuerer Zeit aus der Intensität aller sich im Boden abspielenden Zersetzungs- und Umwandlungsprozesse zu ermitteln. Einen Maßstab für die Gesamtheit dieser Prozesse bildet insbesondere die Kohlendioxyd-Produktion des Bodens, und, da diese durch Erhitzen oder Antiseptika im Boden aufgehoben wird, müssen diese Vorgänge auf biologische Ursachen zurückgeführt werden, hauptsächlich also auf die Tätigkeit von Mikroorganismen.

Es verdienen sonach alle Faktoren, die die nützliche Entfaltung der Mikroorganismentätigkeit im Boden beeinflussen oder begünstigen, eine gebührende Beachtung; es erschien daher von einigem Interesse, auch die Beziehungen der Regenwürmer zu den Bodenbakterien näher kennen zu lernen, um so mehr, als von älteren Forschern gerade den Regenwürmern eine große Bedeutung wegen ihrer Tätigkeit im Boden zugeschrieben worden ist.

Als erster hat wohl Darwin im Jahre 1837 die Aufmerksamkeit insbesondere der Geologen auf die Regenwürmer zu lenken versucht. 45 Jahre später kam er auf denselben Gegenstand zurück und veröffentlichte sein sehr reiches Beobachtungsmaterial in dem bekannten Werke „Bildung der Ackererde“. Einiges aus diesem Werke, was im Verlaufe unserer Darstellung als besonders belangreich sich erweisen wird, mag hier hervorgehoben werden:

Der äußerst kräftige und durch eine Chitinmembran noch gefestete Muskelmagen dient, da dem Regenwurm Zähne oder Kiefer fehlen, als Kaumagen, worin er, durch Verschlucken von vielen kleinen Steinchen, die wie Mühlsteine wirken, die Nahrung zerkleinert (S. 10—11). Überdies verschluckt er beim Bohren von Gängen und in Ermangelung anderer Nahrung große Mengen Erde, deren organische Bestandteile er als Nahrung verwendet (S. 56—59), wodurch die einzelnen mineralischen Partikel in dem Muskelmagen eine Abreibung erfahren (S. 139—145). Die Menge der durch Regenwürmer ausgeworfenen Erde beträgt nach Darwins sorgfältigen Berechnungen pro Jahr und Hektar ca. 25 Tonnen (S. 95), und die Mächtigkeit der daraus gebildeten Erdschicht 0,3—0,6 cm (S. 96 u. 175).

Victor Hensen weist auf die subtile Durcharbeitung des Bodens durch Regenwürmer, auf die innige Vermischung von Pflanzenresten mit den Mineralbestandteilen des Bodens hin, und gibt Zahlen betr. die Häufigkeit der Regenwürmer. Er fand in Norddeutschland auf 1 ha Gartenland 133000 große Regenwürmer (Lumbricus terrestris), auf Getreideland die Hälfte.

P. E. Müller gibt für Dänemark bedeutend höhere Zahlen an, und zwar 400000 pro ha. Er schätzt besonders die Wühlarbeit der Regenwürmer im Boden und führt die Bildung des Mullbodens, besonders in Buchenwäldern, auf das innige Vermischen der Waldstreu mit dem Erdreich durch die Regenwürmer zurück; nach ihm erreicht der Boden durch keine Bearbeitungsweise eine derartig lockere und krümelige Beschaffenheit, wie sie durch Regenwürmer zustande gebracht wird.

Auch Ramann (S. 125) hält die Arbeit der Regenwürmer für ein wichtiges Hilfsmittel der Bodenlockerung; besonders auf schweren Böden erleichtern sie sehr den Wasserabfluß.

E. Henry (S. 131—132) stellte Beobachtungen über die Menge des von Regenwürmern im Walde verzehrten Laubes an. 5 Regenwürmer verzehrten innerhalb 66 Tagen 6,5 g Blätter (Trockensubstanz), darunter mit Vorliebe Hainbuchenblätter (90 % der verabreichten Blätter, weniger Buchen- und Eichenblätter [30 %]).

Wollny hat experimentell die Tätigkeit der Regenwürmer im Boden untersucht. Er konnte durch die Einwirkung der Regenwürmer eine sehr bedeutende Volumzunahme des Bodens (S. 41), ferner eine außerordentlich große Zunahme der Luftkapazität und eine Verminderung der Wasserkapazität des Bodens (S. 42) feststellen. Ferner, was uns noch besonders beschäftigen wird, beobachtete er in einem mit Regenwürmern bevölkert gewesenen Boden eine bedeutende Erhöhung der

Zersetzungsvorgänge, durch die Intensität der CO_2-Produktion gemessen (S. 40), und als wahrscheinliche Folge hiervon eine gesteigerte Löslichkeit der Mineralstoffe (S. 41).

C. Dusserre (S. 77) wie auch Hohl (S. 450) konnten in den Exkrementen der Regenwürmer insbesondere eine beträchtliche Zunahme an Salpeterstickstoff gegenüber der Kontrollerde nachweisen.

Im Anschluß an die oben zitierten Arbeiten will ich hier einige Versuche mitteilen, die die Versuchsergebnisse der erwähnten Forscher bestätigen und deren einer die Vermutungen Darwins betr. die Zerkleinerung von Gesteinspartikeln durch Regenwürmer zur Gewißheit erhebt.

I. Versuch.

Ein Topf mit einem Durchmesser von 22 cm wurde mit 6450 g sehr bindigem Lehm gefüllt und auf der ca. 380 qcm betragenden Fläche ca. 100 Blätter von Fagus, Carpinus, Alnus, Coryllus, Acer und Quercus im Gesamttrockengewicht von 31,6 g ausgebreitet. In den Topf wurden nun 2 große Regenwürmer eingesetzt, und durch Begießen mit destilliertem Wasser für eine möglichst gleichmäßige Feuchtigkeit gesorgt. Nach Verlauf von 290 Tagen war mit Ausnahme von 7 Eichen- und 2 Buchenblättern neben ziemlich reichlichen Blattstielen und dickeren Nerven alles übrige verzehrt. Die unverzehrten Reste wogen trocken 7,3 g. In dem Zeitraum von 290 Tagen wurden also 24,3 g Trockensubstanz verzehrt, was pro Regenwurm und Monat $1^1/_3$ g ausmacht, also noch mehr wie bei dem Versuch Henrys (S. 132). Daneben wurde eine ca. 0,2 cm mächtige Schicht von Humus auf der Oberfläche abgesetzt, der Lehm durch äußerst zahlreiche Röhren gelockert und an vielen Stellen durch abgesetzte Exkremente dunkel gefärbt. Die Volumzunahme der Lehmmasse betrug 19,2 %.

In drei anderen Versuchen erhielt ich ähnliche Resultate; darunter wurde in zwei Fällen von den Regenwürmern, pro Monat und Regenwurm gerechnet, sogar noch mehr an Blättern verzehrt.

Die bodenlockernde Wirkung der Regenwürmer ist aber weit beträchtlicher, sobald man den Regenwürmern möglichst wenig Nahrung reicht, wie der nächste Versuch zeigt.

II. Versuch.

In einem Topf mit sehr bindigem Lehm im Gewicht von 3630 g und 5 Regenwürmern, denen während 104 Tagen nur 3 kleine zerschnittene Karotten als Nahrung gegeben wurden, war die ganze Erd-

masse völlig durchwühlt; die ganze Lehmmasse schien, ihrem Aussehen nach zu urteilen, durch den Darm der Würmer gegangen zu sein. Die Volumzunahme der Lehmmasse betrug gegenüber einem Kontrolltopf mit reichlicher Beigabe von Blättern und Karotten 31 %. Zwei andere Versuche dieser Art ergaben ähnliche Resultate.

III. Versuch.

Ein Topf wurde mit 4946,2 g trockenem Granitpulver, das vorher sorgfältig in 4 verschiedene Korngrößen gesiebt worden war, gefüllt, mit destilliertem Wasser befeuchtet, in eine Porzellanschale zwecks Abfangens der mit dem Wasser etwa durchsickernden kleinsten Gesteinsteilchen gestellt, darin 15 große Regenwürmer gebracht und bedeckt ins Dunkelzimmer gestellt. Während der Versuchsdauer wurden die Regenwürmer mit Karotten, Zwiebel- und Lindenblättern gefüttert, der Topf von Zeit zu Zeit mit destilliertem Wasser begossen.

Das Eindringen in die dichte Pulvermasse bereitete den Regenwürmern anfänglich große Schwierigkeiten, denn zwei von ihnen lagen am nächsten Tage tot und ein dritter befand sich noch am dritten Tage auf der Oberfläche. Nach 3 Monaten wurden die Regenwürmer, deren sich nur noch 6 vorfanden, herausgenommen, die Blattreste abgesiebt resp. aufgelesen, der Topfinhalt gesiebt und gewogen.

Die untenstehende Tabelle gibt über das Resultat des Versuches Aufschluß:

	Korngröße I 0,42—1,8 mm	Korngröße II 0,19—0,42 mm	Korngröße III 0,1—0,19 mm	Korngröße IV bis 0,1 mm	Summa in g
Gegeben in g .	2259,7	1511,6	829,7	345,2	4946,2
Wiedergefunden in g . . .	2192,8	1514,7	871,8	384,8	4964,1
Zu- oder Abnahme in g .	— 66,9	+ 3,1	+ 42,1	+ 39,6	+ 17,9
Zu- oder Abnahme in % .	— 3 %	+ 0,2 %	+ 5,2 %	+ 11,4 %	+ 0,36 %

Die geringe Zunahme des gesamten Pulvers, wie sie die Tabelle zeigt, stammt neben den unvermeidlichen Wägefehlern aus der Trockensubstanz der verzehrten Nahrung und aus jener der abgestorbenen 7 Regenwürmer und deren Darminhalt beim Einbringen der Würmer in den Topf, wiewohl die Würmer vor dem Einbringen in einem Glaszylinder einen Tag lang gehungert und sich entleert haben. Wichtig ist die Zunahme der kleineren Korngrößen. Wenn wir auch von der

Zunahme von rund 40 g der kleinsten Korngröße 18 g als auf Verdauungsreste der Nahrung abziehen, verbleibt immer noch ein Plus von ca. 22 g. Um nun von vornherein sicher zu sein, daß eine etwaige Zunahme der kleineren Korngrößen nicht etwa auf das zur Trennung der verschiedenen Korngrößen notwendige Sieben zurückzuführen sei, resp. um den Grad der Abreibung der Körner bei dem Siebeprozeß kennen zu lernen, machte ich einen entsprechenden Vorversuch:

In das Sieb wurde eine Portion von 250 g Granitpulver, d. i. diejenige Portion, die ich nach Ablauf der Versuchsdauer zur Trennung der einzelnen Korngrößen in das Sieb gab, getan und dieselbe wurde 7 mal je 3 Minuten lang geschüttelt.

Das Resultat war ein solches:

Gegeben:	Korngröße	I	100 g	Gefunden	97,8 g
	"	II	75 "		75,3 "
	"	III	50 "		50,3 "
	"	IV	25 "		25,8 "
				Verlust	0,8 "
	Summa		250 g		250,0 g

Nach jedesmaligem 3 Minuten langem Schütteln wurden die einzelnen durchgesiebten Korngrößen gewogen, wobei es sich herausstellte, daß 5 maliges je 3 Minuten anhaltendes Schütteln die richtigen Resultate ergibt, während erst längeres Schütteln zu einer Zunahme des feineren Pulvers infolge Abreibung führt, wie dies oben gezeigt wurde. Daher siebte ich nach Ablauf der Versuchsdauer die einzelnen Portionen des Granitpulvers nur je 5 mal je 3 Minuten lang, weswegen der durch Abreibung der Gesteinspartikel durch das Schütteln verursachte Fehler nur gering sein und nicht für das Entstehen der gefundenen Differenzen verantwortlich gemacht werden kann.

Was nicht minder für eine Zerkleinerung der Gesteinspartikel in den Kaumagen der Regenwürmer spricht ist der Umstand, daß die ausgeworfenen Exkremente, trotzdem das Granitpulver beim Einfüllen gut vermengt worden war, zumeist aus sehr feinem Gesteinspulver, vermischt mit Nahrungsresten (dunkle Färbung), bestanden; es ist aber unmöglich anzunehmen, daß die Würmer sich gerade nur die kleinsten Partikel zum Verschlucken hätten ausgewählt.

Obiger Versuch erweist die durch Darwin auf Grund vielfacher Beobachtungen ausgesprochene Vermutung, daß Regenwürmer kleine Gesteinspartikel zu zermahlen vermögen, als richtig, und vermag auch eine Erklärung der Ergebnisse von Wollnys Versuchen in bezug auf

die größere Minerallöslichkeit eines mit Regenwürmern bevölkerten Bodens zu geben: Durch das Zermahlen der kleineren Gesteinsteilchen werden nämlich immer neue frische Flächen der Wirkung gesteinslösender Agentien ausgesetzt.

2. Die Bakterienflora des Darmes und der Exkremente der Regenwürmer.

Die erwähnten Ergebnissse Wollnys über die erhöhte CO_2-Produktion und die Löslichkeit der Mineralsubstanzen in einem von Regenwürmern bewohnten Boden scheinen auch für eine erhöhte Zahl von Bakterien in einem solchen Boden zu sprechen.

Es ist ja bekannt, daß die Bakterien in allen tierischen Exkrementen überaus zahlreich vorkommen resp. sich entwickeln. Und doch finden wir trotzdem, wenn wir von der Deutung Dusserres und Hohls, welche das reichlichere Vorkommen von Salpeter in den Wurmexkrementen auf ein reichlicheres Vorkommen von Nitrifikationsmikroben darin zurückführen, absehen, in der spärlichen Literatur nur gegenteilige Ansichten vertreten.

Hjalmar Jensen (S. 459) gibt an, daß Denitrifikationsbakterien im Regenwurmdarm abgetötet werden.

Auch R. Kolkwitz (S. 672) sagt, daß „im ganzen Verlauf des Darmes der Regenwürmer sich nur verhältnismäßig wenige Bakterien (meist B. mycoides) finden".

Um daher sichere Aufschlüsse über die Darmflora zu erhalten, wurde folgendermaßen verfahren.

Regenwürmer (fast stets Lumbricus terrestris) wurden der Gartenerde (bot. Garten, Basel), später auch anderen Böden (Acker-, Wiesen- und Waldböden) entnommen, möglichst bald unter der Wasserleitung kräftig abgespült, hierauf eine Abspülung derselben mit sterilisiertem Wasser, 1‰ Sublimat und nochmals sterilisiertem Wasser vorgenommen, und mit Chloroform getötet. Sofort wurden die Würmer unter Einhaltung aller aseptischen Kautelen unter einer Kapelle präpariert, und deren Magen- und Darminhalt zur Infektion verschiedener Nährböden, meist aber Agar- und Gelatineplatten, verwendet.

Hierbei ergaben sich keinerlei qualitative Unterschiede zwischen der Magen- und der Darmflora, weshalb von nun an stets 3 Serien von Platten gegossen wurden, die mit Darminhalt, Exkrementen und dem Boden, dem die Regenwürmer entstammten, beimpft wurden. Aber auch hierbei waren keine Unterschiede qualitativer Art bemerkbar, wohl aber fiel es auf, daß bei annähernd gleichen Impfungen (dieselbe Platinöse) sich besonders auf den mit Exkrementen beimpften

Platten viel zahlreichere Kolonien entwickelten und daß auf den mit Darminhalt beimpften seltener Streptothricheen und Schimmelpilze vorkamen.

Im ganzen wurden 26 mal Platten (in Petrischalen) gegossen, darunter 3 mal solche, die unter Luftabschluß und Sauerstoffabsorption durch Pyrogallol unter Glasglocken gehalten wurden. Als Nährsubstrat kamen vorwiegend Peptonagar und Gelatine, daneben auch Leguminoseninfusagar, Regenwurmbouillongelatine, Harnstoffgelatine, heiß dialysierter Agar mit diversen Nährsubstanzen und Kieselgallerte in Verwendung. Außerdem wurden noch öfters Kulturen in den verschiedensten flüssigen Nährmedien angelegt, wie auf Winogradskischer Lösung für nitrifizierende Bakterien, N-freien Lösungen für Buttersäuregärer und Azotobakter, Omelianskischer Lösung für Zellulosegärer, Giltayscher Lösung für denitrifizierende Bakterien und auf anderen.

Hierbei konnten isoliert und bestimmt werden:

21 mal	Fluoreszierende (18 mal B. fluorescens Lehm. u. Neum.)
19 „	B. mycoides Flügge
16 „	B. subtilis Cohn
14 „	B. vulgatus Migula
13 „	Bact. turcosum L. N.
13 „	B. coli L. N.
11 „	Bact. chrysogloea Zopf
9 „	B. implexus Zimmermann
8 „	B. megatherium de Bary
8 „	B. luteus L. N.
7 „	B. mesentericus L. N.
7 „	B. plicatus Frankland
7 „	Bact. profusum Frankland
7 „	Bact. helvolum Zimmermann
7 „	Bact. luteum L. N.
7 „	B. aquatilis Tartaroff
6 „	Bact. Zopfi Kurth
6 „	B. laevis Frankland
6 „	B. nubilis Frankland
6 „	B. arborescens Frankland
6 „	B. albus Eisenberg
5 „	Bact. vulgare L. N. (Proteus, Hauser)
5 „	B. gracilis Zimmermann
5 „	B. stoloniferus Pohl
5 „	Bact. polymorphum Frankland

5 mal	Bact. candicans Frankland
4 „	Bact. concentricum Zimmermann
4 „	Bact. latericium L. N.
3 „	Bact. ochraceum Zopf
3 „	B. scissus Frankland
3 „	B. denitrificans Stutzer
3 „	B. levans Lehmann u. Wolfin
3 „	B. sulcatus Weichselbaum
2 „	B. tumescens A. Koch
2 „	B. brassicae acidae L. N.
2 „	B. fumeus Lembke
2 „	Bact. prodigiosum L. N.
2 „	Bact. violaceum L. N.
1 „	B. mycoides roseus Scholl
3 „	Vibrio aquatilis Günther
1 „	Vibrio terrigenus Günther
16 „	Micrococcus candicans Flügge
6 „	Micrococcus luteus L. N.
6 „	Micrococcus roseus L. N.
4 „	Micrococcus concentricus Zimmermann
3 „	Micrococcus flavus L. N.
3 „	Micrococcus aquatilis Mead Bolton
8 „	Sarcina lutea Flügge
4 „	Sarcina aurantiaca Flügge
2 „	Sarcina alba Zimmermann
2 „	Sarcina flava de Bary
20 „	Streptothrix, meist alba; chromogena, violacea, aurantiaca, einmal eine neue blaue Art.

Auf den anaeroben Platten wuchsen meist nur Plectridien, darunter sehr wahrscheinlich der B. tetani.

Auf Harnstoffgelatine mit 5% Ureum wuchsen nur wenige Arten, darunter sicher der B. Pasteuri Miquel, ein kleineres Stäbchen und eine Coli ähnliche Art, einige Schimmelpilze und eine winzige Mycoideskolonie, dagegen keine einzige Fluoreszenskolonie, obwohl sie sonst nie auf einer Platte fehlten, so daß die Angabe Beijerincks (II. S. 48) über die „Vorflora“ bei Anhäufungsversuchen für Ureumspalter, die im Gegensatz zu jener Miquels steht, auch durch diesen Versuch bestätigt wäre.

Auf dialysiertem Agar, der entweder nach Beijerincks Vorschrift oder heiß dialysiert hergestellt wurde, entwickelten sich ohne Zusatz

von gebundenem Stickstoff verschiedene, jedoch nicht weiter verfolgte Bakterien sehr üppig, besonders schön aber einige Streptothrixarten.

Ähnlich entwickelten sich auch auf Kieselgallerte ohne gebundenen Stickstoff verhältnismäßig zahlreiche Kolonien, darunter besonders schön die mit zunehmendem Alter sich dunkelbraun verfärbenden Azotobakterkolonien, der auf diese Weise bequem rein gezüchtet werden konnte.

Auch nitrifizierende Bakterien wurden auf entsprechenden Lösungen, sowohl wenn diese mit Darminhalt als auch mit Exkrementen beimpft wurden, kultiviert, desgleichen Zellulosegärer und anaerobe Buttersäuregärer.

Nicht jedesmal gelang die Anzucht von denitrifizierenden Bakterien, aber dies betrifft so gut den Boden wie den Darm und die Exkremente.

Auch Crenothrix polyspora konnte aus dem Darm gezüchtet werden.

Neben den 64 genannten Arten konnten noch 34 isolierte Arten nicht identifiziert werden. Diese kamen im ganzen weniger konstant und zahlreich vor wie die verhältnismäßig leichter bestimmbaren bekannten Bodenbakterien.

Eine neue Art aus Regenwurmexkrementen will ich aber schon hier erwähnen, Bacillus extorquens n. sp., die wegen ihres Vermögens, Oxalate, auch Kalziumoxalat, als alleinige Kohlenstoffquelle zu verarbeiten, näher untersucht worden war, worüber noch ausführlicher an anderer Stelle berichtet wird.

Außer den Bakterien wuchsen auf den Platten öfters, wenn auch besonders auf den mit Darm und Exkrementen beimpften bedeutend seltener, Schimmelpilze, meist Mucorarten, Aspergillus und Penicillium; daneben auch wilde Hefen, meist Rosahefe.

Bei der direkten mikroskopischen Betrachtung des Darminhaltes des Regenwurmes und seiner Exkremente sieht man recht zahlreiche Algen, besonders Diatomeen und Euglenaceen, und ebenfalls ziemlich zahlreiche Protozoen.

Die vorstehenden Ergebnisse beweisen, daß die Darmflora des Regenwurmes recht mannigfaltig ist und sich keineswegs von der des Bodens, dem die Regenwürmer entstammen, unterscheidet.

Im Anschluß hieran wurde noch eine Nachprüfung der schon erwähnten Angabe Hj. Jensens über die Vernichtung von denitrifizierenden Bakterien durch den Regenwurm unternommen, um so

mehr, als diese Angabe auch schon in Lafars „Handbuch der Technischen Mykologie", Bd. III, S. 188, übergegangen ist.

Einige Regenwürmer wurden in einen mit Sand gefüllten breiten Glaszylinder gebracht und mit einigen Röhrchen einer gut entwickelten Pyocyaneus-Reinkultur auf Agar eine Woche lang gefüttert. Hierauf wurden 2 Regenwürmer mit einer sterilisierten Pinzette herausgeholt, unter der Wasserleitung gründlich abgespült, dann die Abspülung mit sterilisiertem Wasser, 1 ‰ Sublimat und wiederum mit sterilisiertem Wasser wiederholt. Der eine Regenwurm wurde sofort mit Chloroform getötet und präpariert, von seinem Darminhalt 6 Röhrchen mit Giltayscher Lösung beimpft und außerdem 3 Agarplatten angelegt. Der andere Wurm wurde genau, wie es Jensen (S. 458) getan, in ein sterilisiertes bedecktes Becherglas gebracht, und am nächsten Tage wurden mit den unterdes ausgestoßenen Exkrementen des Wurmes ebenfalls 6 Röhrchen mit Giltayscher Lösung und 3 Agarplatten beimpft. Alsbald zeigten alle Platten eine schöne intensive Fluoreszenz, die Pyocyaneus-Kolonien waren zahlreich entwickelt. Von den 12 Röhrchen mit Giltayscher Lösung zeigten 9 eine sehr starke Gärung mit der typischen feinen Schaumbildung. Die fehlende Schaumbildung in den übrigen 3 Röhrchen glaube ich auf zu geringe Impfmengen (vergl. Löhnis I, S. 448) zurückführen zu dürfen, wodurch eine rasche Überwucherung etwa vorhandener weniger Keime durch andere Bakterien eingetreten war. Wahrscheinlich hat H. Jensen aus demselben Grunde bei seinem Versuch keine Denitrifikation feststellen können, diese aber auf Tötung der Denitrifizierenden im Regenwurmdarm zurückgeführt.

Noch auf eine andere Weise wurde, um ganz sicher zu sein, der Versuch angelegt, und zwar: 3 große Regenwürmer wurden aseptisch präpariert und deren Magen und Darm in eine verschlossene sterilisierte Glasdose aufgeschnitten gelegt. Hierauf wurde mit den Magen- resp. Darmstücken eine Platinöse einer Reinkultur des B. pyocyaneus verrührt und davon jede 2 Stunden Proben zum Beimpfen von Giltayscher Lösung und von Agarplatten entnommen. Hierbei zeigte sich, daß erst nach 18 Stunden (wobei die Glasdose im Thermostat bei 28° stand) der Pyocyaneus von anderen Bakterien überwuchert worden war, so daß nach Ablauf dieser Zeit weder Denitrifikation in der Giltayschen Lösung eintrat noch der Pyocyaneus auf dem Agar sich entwickelte. Durch die Darmsäfte des Regenwurmes erfolgte sonach keine Abtötung des Pyocyaneus und man wird wohl annehmen können, daß auch andere Denitrifizierende ebensowenig abgetötet werden.

Überdies fand ich den B. Stutzeri zweimal im Darm und erhielt öfters bei Beimpfung mit Darminhalt in Giltayscher Lösung Denitrifikation.

Was noch die Streptothricheen anbetrifft, so sind die meisten derselben sicherlich nach Beijerincks Beobachtung und Ausdruck (I, S. 7) oligonitrophil. Eine weiße Art wurde während 4 Monaten auf N-freien Lösungen fortgezüchtet, wobei sie sich recht üppig entwickelte; ich vermute, daß diese Art den stickstoffbindenden Organismen zuzuzählen sei, wenn auch quantitative Versuche nicht unternommen worden sind.

Um auch einen Aufschluß über die quantitativen Verhältnisse der Darmflora des Regenwurmes zu erhalten, wurden zweimal Zählungen mittels der Plattenmethode vorgenommen.

Die Resultate sind in der untenstehenden Tabelle niedergelegt.

Anzahl der Bakterien, Hefen und Pilze pro 1 g Trockensubstanz

	Boden	Darm	Exkremente
Kleeboden, 21 % Wasser, im Dezember bei —3 ° C	11 000 000	10 000 000	52 000 000
Wiesenboden, 18 % Wasser im Mai bei 16 ° C	20 000 000	148 000 000	64 000 000
Exkremente 22 % Wasser			
Darminhalt 47 % „			

Die Bodenproben wurden einer Tiefe von ca. 15 cm entnommen.

Bemerkenswert ist die viel höhere Zahl der Mikroorganismen in den Exkrementen gegenüber dem Boden.

Die Kolonienzahl auf den „Darmplatten" spricht auch hier gegen die Angabe von Kolkwitz.

Bei diesen Zählungen wurde auch versucht, die Häufigkeit der einzelnen Arten festzustellen; die Zahlen waren aber so widersprechend und schwankend, daß sich eine Häufigkeitsskala gar nicht aufstellen ließ. Nur die Streptothricheen scheinen keinen so starken Schwankungen unterworfen zu sein. Sie betrugen in Prozent aller Kolonien

	Boden	Darm	Exkremente
Im Winter:	30 %	10 %	20 %
Im Sommer:	24 %	3,2 %	9 %

Allgemein ist die Abnahme der Streptothricheen im Sommer nur eine relative, da sich dann viele Bakterien mit einem höheren Temperaturbedürfnis rascher entwickeln. Schwieriger ist aber auch die absolute Abnahme der Streptothrixarten im Regenwurmdarm zu erklären. Wahrscheinlich liegt der Grund in der schnelleren Entwicklung der

Bakterien, die auf diese Weise die Streptothricheen überflügeln. Auf festem Substrat kommen nämlich die Streptothrixkolonien weit langsamer zur Entwicklung als viele Bakterien, wie man das auf fast jeder mit Boden beimpften Platte beobachten kann.

Was dann noch die Häufigkeit der einzelnen Arten anbetrifft, so stimmen meine Beobachtungen gut mit denjenigen von Fülles (S. 233) und Houston, ebenso, was das prozentische Verhältnis der Streptothricheen zu den anderen Bakterien im Boden betrifft, mit den von Hiltner (S. 128) gefundenen Zahlen überein.

Schimmelpilze und auch wilde Hefen waren im Darm und Exkrementen ziemlich selten.

Erwähnenswert scheint mir noch der Umstand, daß, was die so oft konstatierte Abnahme der Bakterien mit zunehmender Tiefe im Boden anbetrifft, dies für Regenwurmröhren nicht ganz zutreffend ist. Agarplatten, die mit Erdproben aus einer Wurmröhrenwand aus einer Tiefe von 80 cm und ein andermal von 60 cm beimpft worden waren, wiesen gegenüber Kontrollplatten, die mit Boden aus der gleichen Tiefe infiziert waren, weit höhere Kolonienzahlen auf.

Der Regenwurm verschleppt ohne Zweifel Bakterien in größere Tiefen und versorgt sie dort, durch Auspolsterung seiner Röhren mit Blattresten, Exkrementen u. dergl. mit Nahrungsstoffen.

3. Schlußbetrachtung.

Die exakten Untersuchungen Wollnys haben dargetan, daß der indirekte Anteil der Regenwürmer an den Zersetzungsvorgängen im Boden ein sehr beachtenswerter ist. Unser Versuch I zeigt, wie groß der direkte Anteil der Würmer an der Zersetzung pflanzlicher Substanz ist. Setzt man die Anzahl der Regenwürmer im Walde pro ha gleich 60000[1]), und nimmt man an, daß diese nur ca. 9 Monate pro Jahr tätig sind[2]), und ferner, wie der Versuch I zeigt, daß jeder Wurm pro Monat $1^1/_3$ g pflanzlicher Trockensubstanz verzehrt, so ergibt das pro

[1]) Ramann selbst, der Müllers Angaben über die Zahl der Regenwürmer in den Buchenwäldern Dänemarks für Preußen zu hoch findet, schätzt deren Zahl in Kiefernwäldern mit Buchen auf mindestens 60000; die gleiche Zahl gibt auch V. Hensen für Ackerland in Norddeutschland an; ich selbst fand, obwohl ich allerdings nur kleine Flächen umgegraben habe, in einem Buchenwald bei Basel weit mehr Regenwürmer, als es Ramanns und Hensens Zahlen entsprechen würde.

[2]) Henry (S. 131) fand Regenwürmer noch bei einer Temperatur von -4^0 in der Waldstreudecke tätig.

Jahr und ha 720 kg, was ungefähr, unter Zugrundelegung von Schroeders Berechnungen der jährlichen Streuproduktion im Buchenwald, $^1/_6$—$^1/_7$ der gesamten Streu ausmachen würde.

Doch wohl wichtiger ist die indirekte Einwirkung des Regenwurmes auf die Zersetzung der organischen Stoffe im Boden. In den Exkrementen fand sich stets eine bedeutend höhere Anzahl von Bakterien als im Boden, was dafür spricht, daß die mit dem Mineralboden innig vermischten Verdauungsreste ein besonders günstiges Nährmedium für die Bakterien im Boden darstellen und die Zersetzung organischer Substanz nach einer Passage durch den Regenwurmdarm besonders beschleunigt wird. Ein weiterer indirekter Anteil an der Beschleunigung der organischen Stoffzersetzung beruht auf der sehr starken Lockerung und Durchlüftung des Bodens durch die Regenwürmer (vergl. Wollny, S. 42—43, mein Versuch II), wodurch die Tätigkeit der aeroben Bakterien besonders begünstigt wird und eine schädliche Anhäufung von Säuren, wie sie besonders reichlich Anaerobier bilden, durch deren schnelle Verarbeitung, wie sie bei Luftzutritt stattfindet, verhindert wird.

Welche Bedeutung aber eine Beschleunigung der Zersetzung von organischen Stoffen für die Vegetation hat, das lehren uns besonders eindringlich die großen Torf- und saure Humusablagerungen, in denen die Zersetzungsvorgänge auf ein Minimum sinken und die für die volkswirtschaftlich wichtigen Pflanzen einen sehr ungünstigen Standort bilden.

Was noch die Zersetzung der Mineralbestandteile des Bodens anbetrifft, so hat auch an dieser der Regenwurm einen beträchtlichen Anteil, wie die Versuchsergebnisse Wollnys (S. 41) beweisen. Eine direkte Lösung der Gesteine im Regenwurmdarm wird wohl wegen der schwach alkalischen Reaktion[1]) des Darminhaltes nicht eintreten, wohl wird aber die Zersetzbarkeit der verschluckten Gesteinspartikel ohne Zweifel dadurch gefördert, daß diese im Magen aufs innigste mit der aufgenommenen organischen Substanz vermischt werden und so eher dem Angriff seitens der durch Bakterien produzierten organischen Säuren und besonders des Kohlendioxyds ausgesetzt werden. Abgesehen davon tritt, wie es Darwin vermutete und wie das Ergebnis unseres Ver-

[1]) Darwin (S. 28) und Krukenberg (zit. nach Fürth, S. 175) fanden oft im Magen und im Bereiche der ersten Leibessegmente saure Reaktion. Ich konnte stets nur eine schwach alkalische Reaktion feststellen, und zwar in allen Teilen des ganzen Darmtraktus. Damit scheint auch eher die Tatsache zu vereinigen zu sein, daß die Verdauung des Regenwurms eine tryptische, also nur bei alkalischer Reaktion stattfindende ist, und das Vorkommen von Kalkkonkrementen in den Exkrementen.

suchs III lehrt, eine Abreibung der Gesteinspartikel in dem kräftigen Muskelmagen ein, wodurch die bei der Verwitterung besonders von Feldspaten sich bildenden Kaolin- oder Tonrinden an den einzelnen Gesteinskörnchen entfernt werden. Diese Kaolinrinden würden der weiteren Verwitterung wegen ihrer Unlöslichkeit unüberwindliche Hindernisse bieten, während sie durch eine Passage durch den Regenwurm leicht abgerieben und die Gesteinskörner von neuem der Einwirkung der Verwitterungsagentien ausgesetzt werden.

Die Tätigkeit der Regenwürmer im Boden ist nicht nur für den Gärtner, wie Hensen meint, sondern noch mehr für den Landwirt und besonders für den Forstwirt von großer Bedeutung, und diese sollten auch mehr wie bisher ihre Aufmerksamkeit diesen nützlichen Tieren zuwenden.

II. Über die Zersetzung von Orthoklas durch Bodenbakterien.

Einleitung.

Die Untersuchungen über den Anteil der biologischen Faktoren an der Zersetzung der bodenbildenden Gesteine datieren eigentlich seit Jul. Sachs' berühmt gewordenen Korrosionsversuchen auf poliertem Marmor.

Durch diese Versuche gewann die alte Theorie von den Wurzelsekreten, obwohl Sachs die Frage nach der Natur des durch Wurzeln sezernierten Sekretes offen gelassen hatte, eine neue Bedeutung, weshalb seither mehrere Forscher diese Frage eingehend behandelt haben.

Nach Czapek, der auf künstlichen Kalziumkarbonat- und Kalziumphosphat-, nicht aber auf Aluminiumphosphatplatten Korrosionen durch Pflanzenwurzeln erzielte, hat den Hauptanteil an der Gesteinslösung das durch die Wurzeln ausgeatmete Kohlendioxyd (S. 389).

D. Prianischnikow findet große Unterschiede in der Ausnutzungsfähigkeit schwerlöslicher Phosphate durch verschiedene Pflanzen (I. 412, II. 188—189) und scheint dem Kohlendioxyd die Hauptrolle bei der Phosphatlösung zuzuschreiben, da er glaubt, daß vergleichende Untersuchungen über die Atmungsenergie der betreffenden Pflanzen seine Versuchsergebnisse wohl zu erklären vermöchten (II. 189).

G. Kunze, der nur auf Marmor und Wollastonit Korrosionen zu erzielen vermochte (365 u. 366), führt deren Entstehung auf CO_2-Wirkung zurück, da die verschiedenen Pflanzen unabhängig von ihrer Säuresekretion durch Wurzeln die genannten Gesteine korrodierten. Trotzdem aber, obwohl das überaus kümmerliche Wachstum seiner Versuchspflanzen

auf Leuzitbasalt- und Granitpulver (S. 367—369) eine andere Deutung zuließe, und obwohl er selbst (S. 367) den höheren Pflanzen die Fähigkeit, unverwittertem Gestein die nötigen Nährsalze zu entnehmen, abspricht, konkludiert er (S. 391), daß die durch die Wurzeln produzierte Säure die Bodenmineralien angreife und somit ernährungsphysiologische Bedeutung habe.

J. Stoklasa und A. Ernest, die die Forderung Prianischnikows in bezug auf vergleichende Untersuchungen der Atmungsenergie der Wurzeln verschiedener Pflanzen erfüllen (III, S. 84—86, 102), halten das Kohlendioxyd für das einzige Produkt, das bei der normalen Atmung der Wurzeln ausgeschieden wird (S. 62), führen die Bildung organischer Säuren durch die Wurzeln auf pathologische Prozesse infolge behinderter Sauerstoffatmung zurück (S. 64) und bestreiten aufs entschiedenste die Ausscheidung von Monokaliumphoshat (S. 61), wie es Czapek beobachtet haben will und welches nach dessen Ansicht (S. 332) durch Umsetzungsvorgänge mit den Bodenmineralien für die Nährstoffaufnahme der Wurzeln von Bedeutung wäre.

Die durch Gramineenwurzeln bewirkte Gesteinslösung finden sie ungefähr proportional der Intensität der CO_2-Ausscheidung (III, 90—101), wenn auch überhaupt die durch Gramineen unverwittertem Gestein entzogenen Nährsalzmengen äußerst minimal sind (vergl. III, 93 u. 97).

Die Resultate aller bisherigen Versuche in bezug auf Gesteinslösung durch Wurzeln der höheren Pflanzen lassen sich kurz dahin zusammenfassen, daß nur Karbonate von Kalzium und Magnesium, Phosphate von Kalzium und einfaches Kalziumsilikat merklich angegriffen werden, nicht dagegen die überaus wichtigen Doppelsilikate.

Von Algen ist es wiederholt konstatiert worden, daß sie Kalkgesteine stark zu korrodieren vermögen.

Flechten, von denen es bekannt ist, daß sie überall die ersten sichtbaren pflanzlichen Ansiedelungen auf nacktem Gestein bilden, dringen nach Bachmann (I, 101) in Glimmer ein und zersetzen ihn; auch Granat wird von ihnen stark zersetzt (III, S. 263—266), dagegen scheinen sie nicht Orthoklas, Plagioklas, Hornblende, Augit u. a. anzugreifen (I, 103, II, 17), und ebensowenig Quarz, obzwar Friedrich und Stahlecker von Quarzflechten berichtet haben, und der letztere die Korrosion von Quarz auf Ausscheidung sogar von Fluor seitens der Flechten zurückführt. Nach Bachmann (III, 271) beruht die beschleunigte chemische Einwirkung der Flechten auf Silikate allein auf Abgabe von Kohlendioxyd.

Gesteinslösung durch Pilze hat Kunze beobachtet; durch Auflegen von frischem Waldhumus auf polierte Marmor-, Apatit-, Wollastonit- und Apophyllitplatten konnte er Anätzungen resp. Verlust der Politur erzielen (383). Auch Penicillium glaucum in Pflaumendekokt als Nährsubstrat verursachte auf den genannten Mineralien und auch auf Elaeolith Verlust des Politurglanzes der Platten. Schimmelpilzkulturen auf pulverisiertem Gestein ergaben, daß die betreffenden Pilze aus dem Gestein, besonders aus Leuzitbasalt, ihren Nährsalzbedarf zu beziehen vermögen (S. 384 u. 385). Kunze schreibt sonach den Pilzen eine weit stärkere gesteinsaufschließende Wirkung als den höheren Pflanzen zu (S. 391). S. de Grazia und G. Camiola (I, S. 208) fanden in Kulturen auf gepulvertem Leuzit durch Schimmelpilze ungefähr das Doppelte aus diesem Mineral gelöst gegenüber der sterilen Kontrolle.

Was endlich eine Gesteinslösung durch Bakterien anbetrifft, so hat wohl als erster A. Muntz in dieser Richtung bestimmte Vermutungen geäußert (S. 1370), angeregt durch seine Befunde über das regelmäßige Vorkommen von Nitrifikationsmikroben auf nackten Felsen im Hochgebirge (S. 1371), denen er, besonders mit Rücksicht auf ihre geringe Größe und daher die Leichtigkeit, auch in die feinsten Gesteinsspalten einzudringen, einen wichtigen Anteil an der Gesteinsverwitterung zuspricht (S. 1372).

Seither wiederholen sich in der einschlägigen Literatur des öfteren derartige Hinweise und Vermutungen (Sestini, Behrens, Bredemann).

Experimentell untersuchte zuerst Stoklasa die Befähigung der Bakterien zur Phosphatlösung aus Knochenmehl, wobei er, besonders durch die säureproduzierenden gemeinen Bodenbakterien, wie Bacillus mycoides, B. mesentericus vulgatus, B. megatherium u. a., recht ansehnliche Phosphatmengen in Lösung gehen sah (I, S. 533).

Seither sind Untersuchungen über Phosphatlösung durch Bakterien von zahlreichen Forschern unternommen worden, mit dem Resultat, daß alle eine größere oder geringere Lösung der untersuchten schwer löslichen Phosphate in Bakterienkulturen konstatieren konnten.

Die Hauptwirkung hierbei scheint den durch die Bakterien produzierten Säuren (vergl. Koch u. Körber (S. 571), Körber (S. 463), Perotti (S. 414), Stålström) zuzukommen, wiewohl Sacket, Patten und Brown (S. 701 u. 702) und Stoklasa (IV) auch das Kohlendioxyd nicht unterschätzen. S. de Grazia (II, 271) hält auf Grund seiner Beobachtungen auch die durch Mikroorganismen produzierten Enzyme an der Phosphatlösung beteiligt.

Auch die Kalklösung durch Bakterien wurde von Sackett, Patten und Brown untersucht, wobei 36 von 50 Bakterienarten bei Zuckerdarreichung das Karbonat zu lösen vermochten (S. 702).

Untersuchungen über Silikatzersetzung durch Bakterien liegen bisher nicht vor, obwohl es auf Grund ihrer vielfachen Säureproduktion und der intensiven CO_2-Ausatmung, worüber besonders Stoklasa mit seinen Mitarbeitern eingehend berichtet hat, sehr wahrscheinlich ist, daß gerade die Bakterien an der Silikataufschließung im Boden stark beteiligt sind.

Im allgemeinen könnten Bakterien mittels der folgenden chemischen Faktoren Gesteinszersetzung verursachen:

1. Durch Produktion von Kohlendioxyd,
2. „ „ „ organischen Säuren,
3. „ „ „ Ammoniak (Basenaustausch mit den Mineralien),
4. „ „ „ salpetriger und Salpetersäure durch Nitrifikationsmikroben.

I. Korrosionsversuche.

Zum Nachweis einer biologischen Einwirkung auf die Gesteine bieten Korrosionsversuche große Vorteile, erstens wegen der Handlichkeit dieser Methode und zweitens wegen der Augenfälligkeit ihrer Resultate. Da bisher noch niemals Bakterien zu Korrosionsversuchen verwendet worden sind, so versuchte ich vorerst festzustellen, ob auf leichtzersetzbarem Gestein, z. B. Marmor, Korrosionen durch Bakterienwachstum sich erzielen ließen.

Auf polierte Platten von dichtem Marmor wurde eine 1 prozentige Dextrose-Peptonlösung in M-Formen ausgebreitet; jede dieser M-Formen mit einer aus Regenwurm reinkultivierten Bakterienart, im ganzen 14 Arten beimpft, und die Marmorplatten in Petrischalen, die mit nassem Filtrierpapier gegen Austrocknen der Nährlösung auf den Platten ausgekleidet waren, gesetzt und bei Zimmertemperatur gehalten.

Nach 14 Tagen wurde die Kulturflüssigkeit mit destilliertem Wasser von den Platten gespült, wobei es sich herausstellte, daß nur 3 Bakterien, darunter Bacillus vulgatus, keine Korrosionen des Marmors hervorgebracht haben. Die übrigen Platten erwiesen sich mehr oder weniger stark angeätzt, die M-Form hob sich sehr deutlich von der glänzenden polierten Umgebung ab. Die sterile Kontrolle zeigte in der M-Form den gleichen Glanz wie die Umgebung, nur war sie, wohl durch Eindringen der Nährlösung in den Marmor, ein wenig gelblich verfärbt.

Die stärksten Korrosionen erzeugten Bacterium coli, B. acidi lactici und besonders der B. extorquens n. sp., wo die M-Form ein ganz kreidiges rauhes Aussehen und kleine Grübchen aufwies.

Polierte Platten einer zweiten Serie, die erst nach 2 Monaten untersucht wurden, waren noch bedeutend stärker korrodiert. Die unterdeß ein wenig verdunstete Nährlösung enthielt viele große Kristalle, in der Kultur des B. extorquens solche bis 3 mm Durchmesser, die, ihren Reaktionen gemäß, aus kohlensaurem Kalk bestanden.

Ein analoger Versuch mit feingespaltenen Kaliglimmerblättchen, worauf in Tröpfchen von Bouillon B. mycoides, B. subtilis, B. vulgatus, B. megatherium, B. fluorescens und ein nicht bestimmtes Bakterium geimpft wurden, verlief negativ. Auch nach 2 Monaten behielt der Glimmer noch seinen Glanz und auch bei starker Vergrößerung konnte nicht die geringste Anätzung konstatiert werden.

Bei einem anderen Versuch, wo Glimmerblättchen auf schon entwickelte Agarstrichkulturen der oben erwähnten Bakterienarten gelegt wurden, konnte ein Eindringen von sehr zahlreichen Bakterien zwischen die Glimmerlamellen bis 4 mm vom Rande aus festgestellt werden, auch nahm der Glimmer an den Rändern ein weißliches Aussehen an, doch auch hierbei zeigten die den Bakterienstrichen aufliegenden Glimmerflächen keine Anätzungen.

Allerdings gehört der Glimmer zu den am schwersten zersetzbaren Mineralien, so daß aus diesem Versuch nicht geschlossen werden dürfte, daß Bakterien nicht auch Silikate anzugreifen vermöchten.

II. Kulturen in kalifreien Medien mit Feldspatpulver.

Seit längerer Zeit benutzt man zwecks schnellerer Diagnostik von Milchsäurebakterien zum Plattengießen Agar mit einer Aufschwemmung von recht feingepulverter Kreide. Um die Kolonien der Milchsäurebakterien bilden sich dann nach einigen Tagen aufgehellte Zonen, in denen die Kreide gelöst ist. Ich versuchte darum mit Hilfe dieser Methode unter Anwendung von Feldspatpulver eine etwaige Lösung desselben durch Bakterien festzustellen.

Ein vier Tage lang bei 90—95 ^{0} unter fortwährendem Zufluß von heißem destillierten Wasser dialysierter Agar wurde mit 1 % reinster Saccharose, 0,1 % Asparagin und je 0,05 % phosphor- und schwefelsaurem Ammonium versetzt, und in diesem Agar dann gebeuteltes Orthoklaspulver (von Kragerö, Norwegen) aufgeschwemmt. Als Impfmaterial dienten je eine Öse Erde, Darminhalt und Exkremente vom Regenwurm, worauf Platten in Petrischalen gegossen wurden.

Unter den mannigfaltigen, auf diesem Agar zur Entwickelung gelangten Kolonien waren einige sehr auffallend; diese schleimigen Kolonien bildeten um einzelne größere Orthoklaspartikel Wälle oder Ringe; innerhalb dieser Ringe und über dem Mineralpartikel war gewöhnlich eine größere Gasblase, wohl von Kohlendioxyd. Da auf gewöhnlichem Agar ohne Feldspatzusatz diese Ringbildung nicht eintrat, so schien nur der Feldspat diese Hofbildung hervorzurufen. Eigentümlich aber war es, daß nur das eine Bakterium, und zwar war es Bacillus tumescens A. Koch, diese Hofbildung aufwies.

Um etwaige Veränderungen an den Feldspatpartikeln unter der Einwirkung dieses Bakteriums genau verfolgen zu können, wurden Glaskästchenkulturen angelegt. Diese Glaskästchen bestehen aus festverkittetem Spiegelglas, in den Dimensionen von 6 cm Länge, 4 cm Breite und 1 cm Höhe. Entsprechend große Deckgläser werden mit „Pumpenfett" oder Vaselin auf den geschliffenen Rand dicht aufgelegt, so daß keine Verdunstung des dem Deckglas anhaftenden Nährsubstrats, das wiederum von unten mit einem kleineren Deckgläschen bedeckt werden kann, eintreten kann. Um das Verdunsten von Nährflüssigkeit und deren Kondensation an den Wänden zu verhindern, genügt es, einen Tropfen Wasser in einer Ecke des Kästchens auf dem Boden anzubringen, so daß man wochenlang die Entwickelung von Algen-, Pilz- und Bakterienkulturen ohne jede Störung durch etwaige Konzentrationsänderung der Nährlösung, Luftmangel und dergl. mikroskopisch, bei Wahl von entsprechend dünnen Deckgläsern auch bei stärkster Vergrößerung, verfolgen kann. Diese äußerst praktischen Glaskästchen bieten darum den sonst gebräuchlichen feuchten Kammern aus Pappe, Glasringen und dergl. gegenüber große Vorteile. Auf dem auf die Glaskästchendeckgläser fein ausgebreiteten feldspatpulverhaltigen Agar wurden Striche mit einer Reinkultur des Bacillus tumescens gezogen, deren Entwickelung bei starker Vergrößerung längere Zeit hindurch verfolgt wurde. Die Bakterienstriche, sofern sie über größere Feldspatpartikel zogen, wiesen dieselbe Hofbildung wie auf den Agarplatten auf. An den einzelnen Orthoklassplittern, die beim Ansetzen der Kulturen genau gemessen und gezeichnet wurden, konnte aber auch nach zwei Wochen keinerlei Abnahme ihrer Größe bemerkt werden.

Eine weitere Eigentümlichkeit bei dieser Hofbildung war die, daß ausgewaschenes (mehrere Wochen lang mit destilliertem Wasser täglich kräftig geschütteltes) Orthoklaspulver nicht oder nur sehr selten Anlaß zur Hofbildung bot.

Mittels der Chemotaxis-Methode wurde es versucht festzustellen, welcher Stoff diese Hofbildung veranlasse; jedoch wegen der äußerst geringen Beweglichkeit des B. tumescens verliefen diese Versuche ergebnislos.

Übrigens haben Hofbildung in Bakterienkulturen um Metallsplitter früher schon Behring, Credé, Thiele und Wolff beobachtet; es handelt sich hierbei wahrscheinlich um Giftwirkungen (Nägelis oligodynamische Wirkungen); daß aber beim Orthoklas Giftwirkungen nicht anzunehmen sind, lehrt deutlich das Verhalten dieses Bakteriums auf dem dialysierten Agar mit und ohne Feldspat, desgleichen in einer kalifreien Lösung mit und ohne Zusatz von Feldspatpulver.

Auf dem eingangs erwähnten Agar mit Zusatz von pulverisiertem Orthoklas entwickelte sich der B. tumescens völlig normal und bildete nach einigen Tagen sehr reichlich Sporen. Auf demselben Agar ohne Feldspatzusatz bildete er in kürzester Zeit die seltsamsten Involutionsformen und es kam nicht zur Sporenbildung. Daß dieses Verhalten kein zufälliges ist, konnte an sehr zahlreichen vergleichenden Kulturen zu verschiedenen Zeiten immer wieder festgestellt werden.

Nicht minder different erwiesen sich Kulturen desselben Bacillus in kalifreien Lösungen, die in destilliertem Wasser 1 % Saccharose, 0,1 % Asparagin und je 0,05 % schwefel- und phosphorsaures Ammonium enthielten; die Lösung wurde in Kölbchen von Jenaer Glas verteilt, in die eine Serie (12 Kölbchen) ca. 1 % gepulvertes Orthoklas zugesetzt, während die zweite Serie keinen Zusatz erhielt. Hierauf wurden die beiden Serien mit einer Sporenaufschwemmung in einer ebensolchen kalifreien Lösung beimpft.

Nun wurde die Entwickelung des Bakteriums in den einzelnen Kölbchen fortlaufend mikroskopisch kontrolliert. Dabei ergab sich, daß nach Verlauf von 16—18 Stunden die Sporen in den Kölbchen mit Feldspatzusatz sämtlich ausgekeimt waren, nicht dagegen in der Serie ohne Feldspat.

In den Kölbchen dieser Serie erfolgte die Auskeimung durchweg erst 24 bis 41 Stunden später. Während ferner die ausgekeimten Stäbchen in der Feldspatserie ein normales Aussehen behielten und noch 48 Stunden nach dem Auskeimen ihre übliche geringe Beweglichkeit aufwiesen, konnte kein einziges bewegliches Stäbchen in den feldspatfreien Kölbchen bemerkt werden; überdies waren in dieser Serie schon nach 24 Stunden (von der Keimung an gerechnet) sehr zahlreiche Involutionsformen vorhanden und auch die übrigen nicht involierten Stäbchen wiesen eine starke Körnung auf. In der Feldspatserie waren

24 Stunden nach der Keimung die Feldspatpartikel von Bakterienflocken dicht umgeben.

Die Hälfte der Kölbchen beider Serien wurde nach Verlauf von 13 Monaten nochmals mikroskopisch geprüft. In den Kölbchen der Feldspatserie bildete der Feldspat dicht mit Bakterien durchsetzte Konglomerate; viele Bakterien wiesen noch normales Aussehen auf, es waren sehr wenige Involutionsformen, dagegen sehr viel Sporen. Der Inhalt der Kölbchen ohne Feldspat dagegen wies lauter zerfallene Stäbchen auf und keine Sporen.

Die so frappanten Unterschiede im Wachstum beider Serien lassen sich nur durch das Fehlen von Nährsalzen in genügender Konzentration erklären. Der Aschengehalt der Sporen reichte in der feldspatfreien Serie wohl zu einer anfänglichen Entwicklung aus, wenn auch schon die Keimung merklich verzögert worden war; zur weiteren normalen Entwicklung und Vermehrung aber war der Mineralvorrat der Sporen offenbar zu gering, die Bakterien degenerierten und vermochten keine Sporen mehr zu bilden.

III. Quantitative Bestimmung des in Bakterienkulturen in Lösung gegangenen Feldspates.

Wenn auch aus dem vorhin besprochenen Versuch zu schließen ist, daß Bakterien ihren Mineralbedarf einem unverwittertem pulverisierten Feldspat zu entziehen vermögen, so ist doch die Frage nach der quantitativen Seite dieses Prozesses von größerer Bedeutung. Da aber von vornherein mit einer nur sehr geringen Lösung des Feldspats gerechnet wurde, sind die quantitativen Versuche mit der allergrößten Sorgfalt und Genauigkeit ausgeführt worden.

I. Versuch.

Das für diese Versuche verwendete destillierte Wasser wurde in einem Destillierapparat von Jenenser Glas nochmals zweimal destilliert und in Jenenser Glasgefäßen aufbewahrt. Alle Chemikalien wurden von Merck-Darmstadt als „chemisch rein“ bezogen, außerdem von der Dextrose 5 g und vom Asparagin 2 g auf Platinblech verascht, wobei keinerlei Rückstand verblieb. Die Kulturgefäße, Erlenmeyerkölbchen aus Jenaer Glas von 200 ccm Inhalt, wurden 1 Tag mit konzentrierter Chromschwefelsäure stehen gelassen, hierauf gründlich und wiederholt mit dem 3fach destillierten Wasser gespült und schließlich mit diesem Wasser gefüllt 2 Wochen lang stehen gelassen. Das Feldspatpulver (unverwitterter Orthoklas von Kragerö, Norwegen) dessen Korngröße bis 0,4 mm betrug, wurde gelinde geglüht (nach Bischof, Bd. II, S. 393,

wird Orthoklas durch Glühen nicht verändert) und hierauf in die einzelnen Kulturkolben möglichst genau abgewogen.

Die Nährlösung, aufs sorgfältigste bereitet, enthielt:

1000 ccm Wasser
10 g Dextrose puriss. Merck
1 „ Asparagin puriss. Merck
0,5 „ phosphorsaures Ammon puriss. Merck
0,5 „ schwefelsaures Ammon puriss. Merck

Hiervon wurden je 25 ccm in die einzelnen Kulturkölbchen abpipettiert, nach erfolgter Sterilisation mit je einer Spur von einer Agarreinkultur der betreffenden Bakterien beimpft und im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufgestellt und sich selbst überlassen.

Während der ganzen Versuchsdauer wurde die Kulturflüssigkeit 4mal auf ihre Reaktion hin geprüft, und dabei das Feldspatpulver aufgeschüttelt. Die Reaktion war in allen beimpften Kölbchen sauer, in einigen sogar stark sauer geworden, während die sterilen Kontrollen, wie zu Anfang, so auch später die neutrale Reaktion beibehielten. Etwa verdunstete Flüssigkeit wurde nicht nachgefüllt.

Die Entwicklung der Bakterien war in allen Kölbchen eine gute, in einigen sogar sehr stark. In manchen Kölbchen war das Feldspatpulver derart von Bakterien durchsetzt, daß es sich nicht mehr aufschütteln ließ.

Nach Ablauf der Versuchsdauer wurden die Kulturen mit dem Feldspatpulver durch sehr dichte Goochtiegel klar filtriert (die Goochtiegel wurden vorher auf ihre Fähigkeit, auch feinstes Pulver zurückzuhalten, sorgsam geprüft. Papierfilter waren ungeeignet, da kein einziges der im Handel erhältlichen Papiere völlig klare Filtrate gab), die Tiegel in größeren Porzellantiegeln auf Asbestringen aufgehangen und bei ca. 400^0 (Blei wurde in einem Versuchstiegel geschmolzen, nicht aber Zink) bis zur Gewichtskonstanz erhitzt.

Die Bakterienmasse ließ sich hierbei, besonders wenn sie mit dem Orthoklas gut vermengt war, ziemlich leicht veraschen, so daß der Feldspatrückstand seine ursprüngliche Farbe, mit einem schwachen Stich ins Rötliche, behielt.

Zur Feststellung des bei diesen Operationen unvermeidlichen Fehlers wurden 9 blinde Versuche ausgeführt, in denen der Durchschnittsfehler, mit geringen Schwankungen in den einzelnen Versuchen, —0,21 % betrug.

Tabelle I.

Nr. des Kulturgefäßes	Beimpft mit	Kulturdauer in Tagen	Orthoklaspulver Gegeben in g	Wiedergefunden in g	Verlust in g	Verlust in %	Im Filtrat nachgewiesen
1	B. acidi lactici Hueppe	301	1,2318	Pilzinfektion		—	—
2		305	1,0348	1,0267	0,0081	0,78	?
3	B. lactis acidi Leichm.	321	1,4384	1,4247	0,0137	0,945	K und SiO_2
4		307	1,4392	1,4253	0,0139	0,96	K „ SiO_2
5	B. tumescens A. Koch	293	1,1483	1,1342	0,0141	1,22	K „ SiO_2
6		308	1,1238	1,0463 ?	?	?	—
7	B. pyocyaneus	306	1,1800	1,1736	0,0064	0,54	?
8		311	1,1981	1,1912	0,0069	0,57	?
9	B. subtilis	320	1,0128	1,0066	0,0062	0,61	?
10	Sterile Kontrolle	309	1,9733	1,9649	0,0084	0,42	?
11	B. mycoides	310	1,0453	1,0338	0,0115	1,10	K und SiO_2
12		312	1,0582	1,0457	0,0125	1,15	K „ SiO_2
13	B. coli	313	1,3077	1,2971	0,0106	0,81	K „ ?
14		315	1,3481	1,3362	0,0119	0,88	K „ SiO_2
15	B. prodigiosus	314	0,9695	Pilzinfektion		—	—
16		317	0,6447	0,6378	0,0069	1,07	K
17	B. vulgatus	302	0,7959	0,7884	0,0075	0,94	?
18	Sterile Kontrolle	309	0,9420	0,9389	0,0031	0,33	?
19	B. megatherium	310	0,9296	0,9187	0,0109	1,17	K und SiO_2
20	B. fluorescens	313	0,6986	0,6918	0,0068	0,97	K „ SiO_2
21	B. chrysogloea	312	0,6866	0,6804	0,0062	0,90	SiO_2

Die Filtrate, die aus der Kulturflüssigkeit und stets 50 ccm destilliertem Wasser, das zur gründlichen Entfernung auch der geringsten Feldspat- und Bakterienreste aus den Kulturgefäßen in kleinen Portionen verwendet wurde, bestanden, wurden eingeengt, im Platintiegel eingedampft und zur Entfernung des etwa noch vorhandenen unverbrauchten Zuckers und der Ammonsalze geglüht, mit schwacher Salzsäure aufgenommen, in 2 Portionen geteilt und auf Kali mit Chloroplatinat, auf Magnesia mit Ammoniumnatriumphosphat, auf Kalzium mit heißem Ammonoxalat und auf Kieselsäure geprüft.

Die Tabelle auf Seite 23 gibt über die Resultate Auskunft.

Die Tabelle zeigt vor allen Dingen eine größere Löslichkeit des Feldspates in den Bakterienkulturen, in welchen im Durchschnitt 0,91 % des gegebenen Feldspatpulvers gelöst worden war, gegenüber den sterilen Kontrollen, mit einer Löslichkeit im Durchschnitt von 0,38 %. Kali war im Filtrat, wo angegeben, deutlich nachweisbar an den wohlausgebildeten goldgelben oktaëdrischen, in Alkohol unlöslichen Kristallen von $K_2(PtCl_6)$. Auch Kieselsäure war in den meisten Filtraten, beim Abdampfen mit Salzsäure, Aufnehmen mit Natronlauge und wiederholtem Eindampfen mit Salzsäure, wobei sich ein in Salzsäure unlöslicher, weißlicher, amorpher Niederschlag bildete, nachzuweisen. Nicht nachweisbar blieben Magnesium und Kalzium, dagegen gaben die meisten Filtrate mit Kaliferrozyanat eine Blaufärbung, also Eisen.

Beim Versetzen der stark eingeengten Filtrate mit schwacher Salzsäure brausten einige, wenn auch schwach, auf, weshalb ich annehme, daß bei der Lösung des Feldspatpulvers das durch die Bakterien ausgeatmete Kohlendioxyd eine größere Rolle spielte, als die aus Zucker gebildeten Säuren; auch waren alle Filtrate mehr oder weniger sauer, die Säuren scheinen demnach im Überschuß gegenüber den gelösten Basen vorhanden gewesen zu sein, und trotzdem gingen nur derart geringe Mengen Orthoklas in Lösung. Um daher sicherere Anhaltspunkte über die Lösung von Feldspat einzig durch Kohlendioxyd seitens der Bakterien zu gewinnen, unternahm ich den folgenden Versuch mit dem Bacillus extorquens n. sp., von dem es festgestellt wurde, daß er aus Oxalaten nur CO_2, aber keine organischen Säuren bildet.

II. Versuch.

Für die Kulturen in diesem Versuch wurde leitunfähiges Wasser, das im hiesigen chemischen Institut hergestellt und in einem mit reinstem Paraffin ausgekleideten Kolben von Jenaer Glas aufgefangen und aufbewahrt wurde, verwendet.

Die Nährlösung bestand aus:

0,25 % Ammonoxalat puriss. Merck
0,025 % Ammonphosphat puriss. Merck und
0,025 % Ammonsulfat puriss. Merck.

5 g des von Merck als „puriss." bezogenen Ammonoxalates und 5 g einer gleichen kristallisierten Oxalsäure, die während des Versuches wegen dem fortgesetzten Verbrauch des $C_2O_4^{\cdot\cdot}$ zur Neutralisation der Kulturflüssigkeit verwendet wurde, hinterließen, auf Platinblech verascht, keinen Rückstand.

Als Kulturgefäße dienten zwei 2-Liter-Kolben von Jenaer Glas und zwei Quarzkölbchen von 25 ccm Inhalt.

Das in die Versuchsgefäße aufs sorgfältigste eingewogene gelinde geglühte Orthoklaspulver (von Kragerö, Norwegen) war weniger fein wie das im vorigen Versuch angewandte. Ca. 25 % des Pulvers hatten eine Korngröße von über 0,42 mm. Die Operationen mit der Wiederwägung des Pulvers nach Ablauf der Versuchsdauer waren dieselben wie im vorigen Versuch.

Die Filtrate erfuhren hier eine andere Behandlung mit Rücksicht auf die Abwesenheit von Zucker und Asparagin. Sie wurden eingeengt, mit $CaCl_2$ etwa noch vorhandene Oxalsäure gefällt[1]), filtriert, eingedampft und das Ammoniak durch Erhitzen verjagt. Darauf mit schwacher Salzsäure aufgenommen, in 2 Portionen verteilt und die Bestimmung von Kali, Magnesium, Eisen und Kieselsäure wie im vorigen Versuch durchgeführt. Die Filtrate der zwei sterilen Kontrollen waren, wie zu Beginn des Versuches, neutral, die der Bakterienkulturen sehr stark alkalisch (wohl wegen überschüssigem Ammon, da sie beim Versetzen mit Salzsäure nicht aufbrausten).

Die folgende Tabelle II gibt über die Resultate Aufschluß.

Überraschend war die aus der Tabelle ersichtliche starke Lösung des Orthoklases durch den B. extorquens; in den Kulturen war allerdings das Gesteinspulver durch dicke und zähe Häute dieser Bakterie derart umhüllt, daß es sich nicht aufschütteln ließ, auch zeigte die immer wieder stark alkalisch werdende Flüssigkeit, besonders im Kolben 2 bei Zusatz der zur Neutralisation notwendigen Oxalsäure Bläschenbildung; immerhin wurde eine derart bedeutende Lösung des

[1]) Die in den Bakterienkulturen noch vorhandene geringe Oxalatmenge wurde in einer kleinen Portion durch Titrieren mit $^1/_{10}$ n $KMnO_4$ festgestellt und danach der Zusatz von $CaCl_2$ bemessen.

Gesteins nicht erwartet, sonst wäre versucht worden, wenigstens im Filtrat des Kolbens 2 das Kali quantitativ zu bestimmen.

Überdies wird wohl, besonders im Kolben 2, noch mehr Orthoklas in Lösung gegangen sein, aber die Feststellung der genauen Menge wurde dadurch vereitelt, daß die dicken Bakterienhäute beim Erhitzen des Rückstandes im Goochtiegel sich nicht völlig veraschen ließen, so daß ein beträchtlicher Teil der Bakterientrockensubstanz als ungelöster Feldspat in der Tabelle figuriert.

Tabelle II.

	Nr. des Versuchsgefäßes	Kulturflüssigkeit in ccm	Beimpft mit	Kulturdauer in Tagen	Orthoklaspulver				Im Filtrat nachgewiesen
					Gegeben g	Gefunden g	Verlust in g	Verlust in %	
Jenaer Glas	1	1000	ster. Kontrolle	68	16,9866	16,9704	0,0162	0,09	K
	2 [1]	1000	B. extorquens	64	10,7197	10,3282	0,3915	3,65	sehr stark K; SiO_2, Fe. unsicher Mg.
Quarz	3	10	ster. Kontrolle	60	0,7377	0,7359	0,0018	0,24	?
	4 [2]	10	B. extorquens	62	0,8318	0,8045	0,0273	3,28	K und SiO_2

Die Menge des durch den B. extorquens im Kulturkolben Nr. 2 gebildeten Kohlendioxyds betrug ungefähr 5 g, welche Menge berechnet wurde aus den Ergebnissen anderer Versuche, betreffend die Verarbeitung von Oxalaten durch diese Bakterie. Die Lösung des Gesteins konnte nur durch CO_2-Produktion durch die Bakterie verursacht werden, da er keine anderen Stoffwechselprodukte bildet.

Der letztere Versuch lehrt, daß **Bakterien mit starker Atmungsenergie recht bedeutende Mengen Feldspat**, wenn dieser in Pulverform vorliegt, **zu lösen vermögen.**

III. Versuch.

Zum Schluß will ich noch kurz mitteilen, daß Kulturen des Bacillus mycoides, B. subtilis, B. vulgatus, B. fluorescens und zweier Streptothrixarten Feldspatstücke, die sauber abgespalten waren, im Gewichte von je 0,2—5 g, in einer durch Wiederwägung der Stücke sich sicher fest-

[1] Im Laufe des Versuches zur Neutralisation 7,35 g krist. Oxalsäure zugesetzt.

[2] Im Laufe des Versuches zur Neutralisation 0,26 g krist. Oxalsäure zugesetzt.

stellenden Weise nicht angegriffen hatten. Die Bakterien entwickelten sich in den Kulturen, die kalifrei waren, sehr gut, die Gewichtsdifferenzen an den Feldspatstücken lagen aber immer noch innerhalb der Versuchsfehlergrenze.

IV. Schlußbetrachtung.

Von Bischof (Bd. I, 31, 424) und Struve wurde das CO_2-haltige Wasser als das wichtigste Agens bei der Silikatzersetzung erkannt. Neben anderen Forschern haben besonders K. Haushofer, R. J. Müller und Fr. Šicha diesen Vorgang quantitativ verfolgt. In Haushofers Versuchen ging im CO_2-gesättigten Wasser mehr als das Doppelte aus feinstgepulvertem Granit in Lösung als in reinem Wasser (S. 125), im ganzen aber nur 0,086 % in 8 Tagen und der 25fachen Gewichtsmenge Wasser. R. J. Müller fand in 7 Wochen durch die 100fache Gewichtsmenge Wasser unter einem Kohlendioxyddruck von $3\frac{1}{4}$ Atmosphären 0,328 % des angewandten Adulars gelöst (S. 7), während in Šichas Versuchen bei 10—50 Atmosphären Kohlendioxyddruck und der 12—13-fachen Gewichtsmenge Wasser in 1—28 Tagen 0,466—0,86 % des angewandten Feldspates in Lösung gingen (S. 27—31).

In unseren Versuchen, und insbesondere im II. Versuch wurden weit größere Mengen Orthoklas durch die Bakterien in Lösung gebracht, nämlich ungefähr das 10fache des von Müller an ähnlichem Mineral konstatierten.

Auch in unseren Versuchen wurde die Zersetzung des Feldspates hauptsächlich wohl durch das von den Bakterien ausgeatmete Kohlendioxyd verursacht, da in den Kulturen der Bakterien mit starker Atmungsenergie, wie Bacillus tumescens, B. mycoides und besonders B. extorquens größere Mengen Feldspat in Lösung gingen als in den Kulturen der anderen Bakterien. Nach Stoklasas Angaben (IV, S. 401) scheidet 1 g Trockensubstanz des B. mycoides bei 25° in 24 Stunden 0,213 g CO_2 aus; B. extorquens produziert in der gleichen Zeit auf Ammonoxalat nach meinen Versuchen erheblich mehr CO_2, und zwar bis 2,5 g; daher wohl auch eine stärkere Lösung des Feldspates in der Kultur dieser Bakterie.

Die Zeit spielt hierbei, wie ein Vergleich der Resultate von Versuch I mit denen des Versuchs II schon andeutet, und wie es schon Haushofer, Müller (S. 19) und Šicha bemerkten und wie ich es in einer folgenden Publikation zu zeigen gedenke, keine Rolle. Die meisten Bakterien in den Kulturen des I. Versuchs waren bei dessen Abbruch

auch tot, so daß sie keinerlei Wirkung mehr auf das Mineral ausüben konnten.

Wenn man dann einerseits die Resultate von Pflanzenkulturen auf pulverisiertem Gestein von Kunze (S. 368—369), Stoklasa und Ernest (III, S. 93) und Haselhoff mit den Resultaten meiner Bakterienkulturen auf Feldspat vergleicht, und anderseits die durch Bakterien im Boden (auch im Winter durch die sogenannten „glazialen" Bakterien M. Müllers (zit. nach Löhnis I, S. 534) und H. J. Conns (S. 427), der die größte Anzahl Bakterien bei — 8 ° fand und annimmt, daß es auch Bakterien gibt, die sich bei Kälte am besten vermehren) produzierte CO_2-Menge mit der durch Pflanzenwurzeln produzierten (Stoklasa und Ernest II, S. 733, 735) in Vergleich zieht, so gelangt man notgedrungen zu dem Schlusse, daß den Bakterien eine weit bedeutendere Rolle bei der Silikataufschließung im Boden als den anderen biologischen Faktoren zugeschrieben werden muß.

Was noch die Befunde von organischen Säuren in den Wurzelsekreten der Pflanzen seitens Czapek und Kunze anbetrifft, so ist die Bildung dieser Säuren durch Mikroorganismen nicht völlig von der Hand zu weisen. Czapek arbeitete zwar mit sterilisierten Samen (S. 336—338), konnte sogar dann das Doppelte an Ameisensäure (aber nur 0,7 mg!) gegenüber den nichtsterilisierten nachweisen; Kunze hat jedoch auf diese Entstehungsquelle der organischen Säuren überhaupt keine Rücksicht genommen. Die Deutung der Entstehung organischer Säuren an den Wurzeln seitens Stoklasa und Ernest ist allerdings sehr bestechend, immerhin war aber auch bei ihren Versuchen Mikroorganismenwirkung nicht ausgeschlossen. Ich fand stets an den Keimwurzeln und Wurzelhaaren von Helianthus, Lepidium und Cucurbita, deren Samen ich mit 1 ‰ Sublimat sterilisierte, im sterilisierten Wasser abspülte und in sterilisierten Glasdosen keimen ließ, reichlich Bakterien.

Weit weniger ist Mikroorganismentätigkeit bei den Pflanzenkulturen auf pulverisierten Gesteinen in den Versuchen Kunzes, Prianischnikows, Stoklasas und Ernests ausgeschlossen; der Mangel an organischer Substanz in dem Gesteinspulver, wie ihn Stoklasa (III, S. 90) zum Ausschluß von Mikroorganismenwirkung für genügend hält, ist von keiner so großen Bedeutung, da den Bakterien zuerst der auf den Wurzeln auftretende Schleim, hernach die mit der Zeit in größeren Mengen absterbenden Wurzelhaare und ganze Wurzeln genügend Nährmaterial liefert. Künftige Untersuchungen über die Gesteinsaufschließung seitens der Wurzeln müßten, noch mehr als es bisher der Fall war, auf etwaige Mitwirkung von Bakterien Rücksicht nehmen.

Dafür, daß den Bakterien eine bedeutende Rolle bei der Silikataufschließung im Boden zufällt, sprechen auch die bei der Brache gewonnenen Erfahrungen (vergl. Wollny, S. 347, Rümker, S. 62, Droop u. a.).

Die Resultate meiner Versuche lassen sich auf die natürlichen Verhältnisse im Boden gewiß leichter übertragen als diejenigen von Müller und Šicha, die zur Lösung der Mineralien ein unter starkem Druck mit CO_2 gesättigtes Wasser verwendeten.

Die größere Lösung des Feldspats in meinen Bakterienkulturen gegenüber den von Müller und Šicha erhaltenen Resultaten läßt sich wahrscheinlich dadurch erklären, daß nicht nur das bei der Atmung entstehende Kohlendioxyd lösend auf den Feldspat einwirkte, sondern auch daß ein Teil des Gelösten in der Leibessubstanz der Bakterien festgelegt wurde und daß außerdem Umsetzungsvorgänge mit dem Mineral hätten bewirkt werden können (vergl. Versuch II, wo wegen der schnellen Verarbeitung des C_2O_4-Jons das NH_4-Jon frei wurde resp. als $(NH_4)_2CO_3$ auftrat).

Zusammenfassung der Resultate.

1. Qualitativ ist im Darm und in den Exkrementen des Regenwurms dieselbe Bakterienflora vorhanden wie in dem Boden, dem die Regenwürmer entstammen.

2. Im Darm, und besonders in den Exkrementen des Regenwurmes tritt eine starke Vermehrung der Bakterien ein, wodurch die Zersetzungsvorgänge im Boden durch die Regenwürmer sehr begünstigt werden.

3. Der Regenwurm beschleunigt nicht nur mittelbar auch die Zersetzung der Mineralsubstanzen des Bodens, sondern auch unmittelbar durch Zerreiben kleiner Gesteinspartikel in seinem kräftigen Kaumagen und durch Abreibung der bei der Verwitterung an den Gesteinskörnchen entstehenden Kaolinrinden, wodurch neue Flächen der Einwirkung gesteinslösender Agentien ausgesetzt werden.

4. Bakterien vermögen polierten Marmor zu korrodieren und zwischen die Lamellen in Glimmer einzudringen.

5. Dem Feldspat vermögen sie die zu ihrem Wachstum notwendigen Mineralmengen zu entziehen.

6. Vom gepulverten unverwitterten Orthoklas vermögen die Bakterien beträchtliche Mengen in Lösung zu bringen, wobei dem durch sie produzierten Kohlendioxyd die Hauptrolle zufällt.

7. Als ein besonders kräftiger Feldspatzersetzer, wohl infolge seiner großen Atmungsenergie, hat sich Bacillus extorquens n. sp. erwiesen.

Die vorliegende Arbeit wurde im botanischen Institut der Universität Basel (Dir. Prof. Alf. Fischer) ausgeführt.

Die Untersuchungen wurden noch auf andere, bodenkundlich wichtige Mineralien, meist Silikate, ausgedehnt, worüber später ausführlicher berichtet wird.

Literatur-Verzeichnis.

Bachmann, E., I, Die Beziehungen der Kieselflechten zu ihrem Substrat. Berichte d. d. bot. Ges., Bd. XXII, S. 101.

—, II, Die Beziehungen der Kieselflechten zu ihrer Unterlage. Ber. bot. Ges., Bd. XXIX, S. 261.

—, III, Die Rhizoidenzone granitbewohnender Flechten. Jahrb. f. wissensch. Bot., Bd. XLIV, S. 1.

Beijerinck, M. W., I, Über Chinonbildung durch Streptothrix chromogena und Lebensweise dieses Mikroben. Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. VI, S. 2.

—, II, Anhäufungsversuche mit Ureumbakterien. Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. VII, S. 33.

Bischof, Gustav, Lehrbuch der chemischen und physikalischen Geologie, 3 Bde. Bonn 1863.

Conn, H. J., Bacteria in frozen Soil. Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. XXVIII, S. 422.

Czapek, Fr., Zur Lehre von den Wurzelausscheidungen. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. XXIX, S. 321.

Darwin, Charles, Die Bildung der Ackererde durch die Tätigkeit der Würmer. Stuttgart 1882.

Droop, C., Die Brache. Heidelberg 1900.

Dusserre, C., Über die Einwirkung der Regenwürmer auf die chemische Zusammensetzung des Bodens. Landw. Jahrb. d. Schweiz, Bd. XVI, S. 75.

Fülles, P., Bakteriologische Untersuchungen des Bodens von Freiburg i. Br. Zeitschr. f. Hyg., Bd. X, S. 225.

Fürth, Otto, Vergleichende Physiologie der niederen Tiere. Jena 1903.

Grazia, S. de, e Camiola, G., Su l'intervento dei microorganismi nella utilisazione della potassa leucitica. Ref. Biedermanns Zentralbl. f. Agrikulturchem., Bd. XXXVII, S. 207.

Grazia, S. de, Su l'intervento dei microorganismi nell' utilisazione dei fosfati insolubili del suolo da parte delle piante superiore. Ref. Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. XXXII, S. 270.

Haselhoff, E., Untersuchungen über die Zersetzung bodenbildender Gesteine. Ref. Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. XXVII, S. 252.

Haushofer, K., Über die Zersetzung des Granits durch Wasser. Journ. f. prakt. Chemie, Bd. CIII, S. 121.

Hensen, V., Über die Fruchtbarkeit des Erdbodens in ihrer Abhängigkeit von den Leistungen der in der Erdrinde lebenden Würmer. Landwirtsch. Jahrb., Bd. XI, S. 674.

Hiltner, E. und Störmer, K., Studien über die Bakterienflora des Ackerbodens, mit besonderer Berücksichtigung ihres Verhaltens nach einer Behandlung mit Schwefelkohlenstoff und nach Brache. Ref. Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. XII, S. 126.

Hohl, Über landwirtschaftlich wichtige Bodenbakterien. Landw. Jahrb. d. Schweiz, Bd. XVIII, S. 434.

Jensen, Hj., Beiträge zur Morphologie und Biologie der Denitrifikationsbakterien. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt., Bd. IV, S. 401 und 449.

Koch, A. und Kröber, E., Der Einfluß der Bodenbakterien auf das Löslichwerden der Phosphorsäure aus verschiedenen Phosphaten. Ref. Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. XVII, S. 570.

Kolkwitz, R., Beiträge zur Kenntnis der Erdbakterien. Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. V, S. 670.

Kröber, E., Über das Löslichwerden der Phosphorsäure aus wasserunlöslichen Verbindungen unter Einwirkung von Bakterien. Ref. Zentralbl. f. Bakt., Bd. XXIX, S. 462.

Kunze, G., Über Säureausscheidung bei Wurzeln und Pilzhyphen und ihre Bedeutung. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. XLII, S. 357.

Lafars Handbuch der techn. Mykologie, III. Bd. Jena 1904—1906.

Lehmann, K. B. und Neumann, Bakteriologische Diagnostik (Lehmanns med. Handatlanten, Bd. X). München 1899.

Löhnis, F., I, Handbuch der landwirtschaftlichen Bakteriologie. Berlin 1910.

—, II, Ein Beitrag zur Methodik der bakteriolog. Bodenuntersuchung. Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. XII, S. 448.

Matzuschita, Teïsi, Bakteriologische Diagnostik. Jena 1902.

Migula, System der Bakterien, Bd. 2, 1897—1900.

Müller, Jul. Rich., Untersuchungen über die Einwirkung des kohlensäurehaltigen Wassers auf einige Mineralien und Gesteine. Diss. Leipzig 1877.

Müller, P. E., Studien über die natürlichen Humusformen. Berlin 1887.

Muntz, A., Sur la décomposition des roches et la formation de la terre arable. Comp. rend. Paris CX, S. 1370.

Perotti, Renato, Über den biochemischen Kreislauf der Phosphorsäure im Boden. Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. XXV, S. 409.

Prianischnikow, D., I, Über die Ausnutzung der Phosphorsäure durch höhere Pflanzen. Ber. bot. Ges., Bd. XVIII, S. 411.

—, II, Zur Frage über die Wurzelausscheidungen. Ber. bot. Ges., Bd. XXII, S. 184.

Ramann, E., Bodenkunde. Berlin 1905.

Rümker, K. von, Der Boden und seine Bearbeitung. Berlin 1909.

Sachs, Julius, Handbuch der Experimentalphysiologie der Pflanzen. Leipzig 1865.

Sackett, W. G., Patten, A. J., Brown, Ch. W., The solvent action of soil bacteria upon the insoluble phosphates of raw bone meal and natural raw rock phosphates. Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. XX, S. 688.

Sestini, F., Kaolisierende Einwirkung der Wurzeln auf die Feldspate im Erdreich. Landw. Vers.-Stat., LIV, S. 147.

Sicha, Fr., Untersuchungen über die Wirkungen des beim hohen Drucke mit Kohlensäure gesättigten Wassers auf einige Mineralien. Diss. Leipzig 1891.

Stoklasa, Jul., I, Über den Einfluß der Bakterien auf die Knochenzersetzung. Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. VI, S. 526 und 554.

—, und Ernest, A., II, Über den Ursprung, die Menge und die Bedeutung des CO_2 im Boden. Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. XIV, S. 723.

—, III, Beiträge zur Lösung der Frage der chemischen Natur des Wurzelsekretes. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. XLVI, S. 55.

—, IV, Biochemischer Kreislauf des Phosphat-Jons im Boden. Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. XXIX, S. 385.

Stålström, A., Beitrag zur Kenntnis der Einwirkung steriler und in Gärung befindlicher organischer Stoffe auf die Löslichkeit der Phosphorsäure des Trikalziumphosphates. Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. XI, S. 724.

Wollny, E., Zersetzung der organischen Stoffe und die Humusbildung. Heidelberg 1897.

Über Marssonia- und Hendersonia-Formen.

Von Dr. **Ernst Voges.**

Einleitung.

Die beiden Pilzformen, welche unserer Untersuchung zugrunde liegen und zu der Gruppe der Fungi imperfecti gehören, zeigen in ihrem Verhalten, zumal in ihrer Fruchtlagerbildung und biologischen Anpassung solche eigenartigen, interessanten Züge, daß sie als instruktive Beispiele für die Wertung bestimmter morphogenetischer und systematischer Fragen gelten können, die augenblicklich in der Pilzsystematik zur Diskussion stehen.

Marssonia Potentillae Desm.

Das offene Fruchtlager.

Gegen Mitte Juni erscheinen auf dem Erdbeerblatte unregelmäßig gestaltete und unregelmäßig über die Blattfläche verteilte, blutrote Flecke mit dunkler zentraler Partie, worin schon das bloße Auge schwarze Pünktchen, oft dreißig und mehr, erkennt, die sich unter der Lupe wie halbkugelige Pykniden ausnehmen. Sie treten vorzugsweise auf der oberen, weniger häufig auf der unteren Blattseite auf. Weiterhin geht die blutrote Färbung der Battflecke in eine dunkelbraune über. Wie die mikroskopische Untersuchung ausweist, so haben wir es in den Gebilden jedoch nicht mit echten Pykniden zu tun. Von oben gesehen erkennt man nämlich ein rosettenartiges Konidienlager, das wie in einer Schüssel liegt, welche dadurch entstand, daß die von dem Konidienlager buckelartig emporgehobene Kutikula mit unregelmäßigen Schlitzen platzte und die Kutikulalappen zurückrollten. Man sieht auch wohl, wie der Buckel sich mit einem kreisrunden Riß abhob, so daß die Kutikula als zurückgeschlagener Deckel an einer Stelle des Schalenrandes noch haftet, während aus dem schalenartigen Grunde die Konidien hervorquellen.

Der Blattfleckenpilz, den wir vor uns haben, ist morphologisch scharf charakterisiert. Querschnitte durch den Blattfleck geben das folgende anatomische Bild: Die Masse des Fruchtlagers des Pilzes liegt unter der Kutikula (Fig. 1) sowie in der Epidermis. So zwar, daß die Kutikula an dieser Stelle längs gespalten und ihre äußere Hälfte dach- oder kuppelförmig abgehoben ist, während auf ihrer unteren Hälfte, dem Kutikulaboden, das Pilzstroma sich ausbreitet und dabei die Zellen der Epidermisschicht auseinandergetrieben und deformiert hat. Ebenso ist die Palisadenschicht inter- und intrazellulär von dem Pilzmyzel durchwuchert, wie überhaupt das ganze Blattgewebe im Bereiche des Fruchtlagers. Ja, man findet nicht selten eine solche starke Durchwucherung, daß das Myzel, nachdem es die Dicke des Blattes durchquert und die Epidermisschicht der Unterseite durchbrochen hat und hier wieder zutage getreten, an der gegenüberliegenden Blattfläche ein Fruchtlager bildet. Ein Wachstumsvorgang, der auch sonst wohl vorkommt. So bei Pseudopeziza medicaginis Sacc., einem Blattfleckenpilz der Luzerne und des Klees.



Fig. 1.
Durchschnitt durch das offene Fruchtlager von Marssonia Potentillae. *k* Konidienhymenium; *s* Stroma. Vergr. 200.

Von der im Vergleich zu der Mächtigkeit der Hymeniumschicht nur dünnen paraplektenchymatischen Stromaschicht, die auf der Epidermis liegt, erheben sich die Konidien auf kurzen, verkehrt kegelförmigen Konidienträgern. Die Konidien sind zweizellig, hyalin. Die untere Zelle ist wie der einzellige Konidienträger zylindrisch bis kegelförmig, schwach gebogen und auch wohl im mittleren Teile bauchig erweitert, fast doppelt so lang als der nur kurze Träger. Ganz verschieden von der Basalzelle ist die Endzelle der Konidien. Sie ist größer und sichelförmig und sitzt auf der Basalzelle gleichsam wie ein Schnabel. Im Bereiche des Blattflecks sind die Gewebe abgestorben, Struktur und Inhalt zerstört in der schon oft beschriebenen Weise. Wo das Blatt rot erscheint, da sind es die Palisadenzellen, welche den roten Farbstoff enthalten. Er verschwindet allmählich in Glyzerin, indessen die Zellen gelbbraun werden.

Das geschlossene Fruchtlager.

Eine höchst eigenartige Wandlung geht nun im Laufe des Winters und des Frühjahrs mit dem Myzel und Konidienlager der Marssonia Potentillae in dem verwesenden Blatte vor: das offene Fruchtlager wird

nämlich zum geschlossenen. Es entsteht eine Pyknide (Fig. 2). Das zarte, blasse Myzel des Pilzes in dem lebenden Blatte hat in dem absterbenden eine bernsteingelbe Färbung angenommen; die Membranen der Hyphen sind dick- und derbwandiger geworden. Die Hyphenglieder kugelig angeschwollen oder länglich und eiförmig: das Myzel ist zum Dauermyzel geworden. Und indem die Hyphen symphyogen durch Verfilzung zu einem pseudoparenchymatischen Pilzgewebe sich verbanden, das als dicke, derbwandige, kastanienbraune Hülle das Konidienhymenium umschloß und kugelförmig nach aufwärts sich ausdehnte, entstand eine Pyknide mit unregelmäßiger Öffnung. Da das ganze Blattgewebe von Hyphensträngen stark durchwuchert ist, so stehen diese auch mit der Pyknide in Verbindung, die einem Stroma aufsitzt (Fig. 2). Die Pyknidenwandung ist in ihrem basalen Teile 6 bis 8 schichtig; nach dem Scheitel hin wird die Wandung dünner und setzt sich aus 5 bis 6 paraplektenchymatischen Pilzgewebsschichten zusammen. Die Färbung ist im oberen Teile dunkler, als im basalen. Die Pykniden sitzen tief im Blattgewebe, im Palisaden- bezw. im Schwammparenchym. Bei fortschreitendem Wachstum wird die Epidermis gesprengt, so daß sie frei zutage treten und schon mit bloßem Auge erkennbar sind.



Fig. 2.

Durchschnitt durch das geschlossene Fruchtlager (Pyknide) von Marssonia Potentillae. *k* Konidienhymenium; *s* Pyknidenwandung; *o* stromatisches Myzel des Pilzes unterhalb der Pyknide. Vergr. 200.

Der Pilz erscheint somit unter zweierlei Gestalt, so daß man bei ihm von einem Saison-Dimorphismus sprechen kann. Wir sehen ihn in einer Sommerform als Parasit in dem lebenden Erdbeerblatt mit freiliegendem Konidienlager und in einer Winterform als Saprophyt in dem absterbenden Blatte mit geschlossenem Fruchtlager in Gestalt eines Gehäuses.

Einen ähnlichen Dimorphismus finden wir übrigens auch noch bei anderen Pilzen der Gruppe Fungi imperfecti. So erscheint der Blattfleckenpilz Gloeosporium nervisequum (Fuck) Sacc., die Konidienform des Schlauchpilzes Gnomonia veneta (Sacc. et Spg.) Kleb., der ebenfalls ein freies Konidienlager hat, in den abgefallenen Blättern der Platane nach Klebahn[1]) mit einem aus pseudoparenchymatisch verbundenen Hyphen entstandenen braunen Gehäuse, in dessen Innern sich entweder ein einziger Hohlraum befindet, oder es bilden sich Scheidewände aus, indem

[1]) Klebahn, Untersuchungen über einige Fungi imperfecti und die zugehörigen Ascomycetenformen. Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 41. 1905. S. 547.

schwärzliche Hyphen in den Hohlraum vordringen und zu Gewebeschichten zusammenschließen mit Konidienträger und Konidien, die vollkommen denen der G. nervisequum gleichen. Und ferner spricht Lagerberg[1]) von der Bildung von Pseudopykniden des Myzels der Pestalozzia Hartigi Tub. in einer Kultur, wonach diese als kleine, solide Körper entstehen, in denen ein innerer Spalt sich allmählich bildet, von dessen Begrenzungsfläche Konidien allseitig hervorgebracht werden. H. Leininger[2]) erhielt sogar bei seinen Züchtungsversuchen mit Pestalozzia palmarum Cooke je nach der Konzentration des Nährmediums neben Pseudopykniden echte Pykniden.

Sodann fand ich in den abgestorbenen Erdbeerblättern, vergesellschaftet mit dem Pyknidenpilz der Marssonia Potentillae eine Pezizinee, eine Beloniella-Form. Ob ein genetischer Zusammenhang zwischen den beiden Pilzen besteht, das konnte ich nicht nachweisen, da die Kulturversuche mit den Askosporen keine einwandfreien Ergebnisse lieferten. Auf sterilisiertem Erdbeerblattstiel ging aus den aufgetragenen Beloniella-Apothezien einmal eine Ramularia hervor. Auf anderen Substraten kam es nicht zur Fruchtbildung.

Keimung der Sporen.

Ist die Konidie durch abwaschende Regengüsse oder im trockenen Zustande durch die bewegte Luft oder durch ab- und zufliegende Insekten, an deren Füßen die Sporen haften bleiben und an der nächsten Anflugstelle wieder abgesetzt werden, oder ist sie durch irgend ein anderes Verbreitungsmittel von ihrer Ursprungsstätte auf die Blattoberfläche einer neuen Wirtspflanze gelangt, dann sucht sie hier festen Fuß zu fassen. Zunächst dadurch, daß die Spore mit ihrer Schleimhülle an der Unterlage haften bleibt; dann dadurch, daß sie einen Keimschlauch treibt. Zahlreiche Konidien keimen freilich nicht auf dem Blatte; andere treiben aus der Spitze der schnabelförmigen Endzelle der Konidie einen Keimschlauch oder von deren Rücken aus, dessen Wachstum indes alsbald sistiert. Dritte wieder keimen, indem die Zellen quellen und an Größe zunehmen. Die Spitze des Schnabels der Konidie wächst zu einem scharf konturierten, viereckigen, stiftartigen Gebilde aus, während die Zellen sich zu traubenförmigen Hyphengliedern umbilden.

---

[1]) Lagerberg, Pestalozzia Hartigi Tubeuf. En ny fiende i våra plantskolor. (Meddel. fr. Stat. Skogsförsök sauss). Nach einem Referat in: Mykolog. Zentralbl. Bd. I. 1912. S. 48.

[2]) H. Leininger, Zur Morphologie und Physiologie der Fortpflanzung von Pestalozzia Palmarum Cooke. Centralbl. f. Bakt. Bd. 29. 1911. S. 3.

Das häufigste Bild der Sporenkeimung (Fig. 3) ist das folgende: Es geht mit der zweizelligen Spore auf der Blattoberfläche eine auffällige Gestaltsveränderung vor. Sie besteht darin, daß ihre Zellen, wie das auch bei den keimenden Konidien anderer Pilze der Fall ist, so bei Septoria, quellen und stark kugelig anschwellen. Gleichzeitig vollzieht sich eine Einschnürung, so daß das ganze Sporengebilde ein traubenförmiges Aussehen annimmt. Der Schnabel der sichelförmigen Endzelle der zweizelligen Konidie wächst zu einem stabförmigen oder stiftförmigen Organ (Fig. 3m) aus, dessen Bedeutung mir bislang unklar ist[1]). Es ragt nach aufwärts frei in die Luft, während die kugeligen Auftreibungen der Konidie gleich schröpfkopfartigen Haftscheiben auf der Blattoberfläche liegen. Aus der sichelförmigen Endzelle der zweizelligen Spore geht der Keimschlauch hervor, der nach kurzem Verlaufe



Fig. 3.

Sporenkeimung und Infektion von Marssonia Potentillae auf dem Erdbeerblatte. *sp* Spore; *m* stiftförmiger Auswuchs des Schnabels der Endzelle der zweizelligen Konidie; *o* Keimschlauch; *n* Appressorium; *z* Epidermiszellen; *i* Infektionshyphe; *a* Eintrittsstelle der Hyphe in die Wirtszelle. Vergr. 500.

mehrfach und dicht nebeneinander kugelig anschwillt, also die gleiche Bildung wiederholt, welche die Zellen der keimenden Konidien vorhin zeigten. Die kugeligen Anschwellungen sind Appressorien. Nach der letzten Auftreibung, deren man oft drei bis vier zählt, nimmt der Keimschlauch sein früheres Kaliber wieder an und kriecht weiter auf der Blattfläche. Dabei gabelt er sich, so daß wir jetzt schon nach Größe und Verlauf von wohlausgebildeten Pilzhyphen auf der freien Blattoberfläche sprechen müssen, von einer Myzelanlage, welche an jene

[1]) Wie sich nachträglich durch Vergleiche mit Sporenkeimungen anderer Askomyceten, so Ophiobolus herpotrichus Fr., herausstellte, ist das fragliche Gebilde ein in die Dauermyzelform übergegangener Keimschlauch.

der Erysipheen erinnert. Die Gabeläste verlaufen dann weiter über die Blattoberfläche, indem sie wiederholt seitliche kugelige Aussackungen als Haftorgane treiben, bis sie schließlich als Infektionshyphe in eine Zelle dringen, gemeiniglich über oder nahe einer Zellwand. Hier durchqueren sie diese in schräger Richtung, um da, wo mehrere Zellen zusammenstoßen, in die Nachbarzelle zu dringen oder längs der ganzen Zellwandung ringsum in der einen Zelle zu verlaufen.

Es ist nun nicht gesagt, daß der Keimungsprozeß der Spore auf der Blattoberfläche allemal in dieser geschilderten Weise verläuft. Es treten hierin die verschiedensten Variationen auf. Die Stiftbildung und die kugeligen Anschwellungen zu Haftscheiben kehren jedoch als typische Bildungen meist wieder. Man sieht auch wohl, daß die schnabelförmige Spitze der Endzelle, nachdem sie eine derbere, dickere Membran angenommen hat, zur Infektionshyphe weiterhin auswächst, während gleichzeitig auch die Basalzelle einen Keimschlauch aus ihrer Endigung getrieben hat, der ebenfalls in die Kutikula und in die Zelle dringt.

Die gekeimte traubig angeschwollene zweizellige Konidie der Marssonia nimmt dann auf der Erdbeerblattoberfläche eine bernsteingelbe Färbung an. Eine Erscheinung, die bei älteren Hyphen der verschiedenartigsten Pilze ja häufig auftritt und in dem sogenannten Dauermyzel am schärfsten ausgeprägt ist. Aus der Tatsache, daß die keimende Spore imstande ist, auf der Blattoberfläche ein verzweigtes Myzel zu bilden, geht nun hervor, daß sie hier Nährstoffe vorfindet, die ihr ein derartiges Wachstum auch außerhalb ihres Nährwirts ermöglichen. Die Nährquelle liefern wahrscheinlich die Mikroorganismen, welche durch die bewegte Luft sowie durch Niederschläge auf die Blattoberfläche gelangen, um hier über kurz oder lang zugrunde zu gehen und der Zersetzung anheimzufallen. Bei diesem Prozesse fallen dann Nährstoffe für den Marssonia-Pilz auf der Blattoberfläche ab.

Konidien-Aussaaten.

Um zu sehen, wie sich der Marssonia-Pilz in der Fruchtlagerbildung auf künstlichen Nährböden verhielt, unternahm ich mit den Sommer- wie Winterkonidien verschiedene Kulturversuche auf Agar-Pflaumendekokt, Gelatine-Pflaumendekokt, Gelatine-Erdbeerfrucht- und Erdbeerblattdekokt sowie auf Gelatine- Kartoffel- und Birnreibsel und ferner auf sterilisierten Erdbeerblattstengeln. Allein, ich erhielt in meinen Kulturen wohl Myzel, aber es kam zu keiner Fruchtbildung. Es erschienen zwar Hyphenbildungen, in denen ein dünner Hyphenzweig sich schraubenförmig um einen dickeren Hyphenstrang wand, oder ge-

wundene Hyphenäste sich wie zur Kopulation dicht aneinander legten oder blasenförmige und rosettenartig aneinanderschließende Aussackungen entstanden, die an Apothezienanlagen erinnerten. Oder es zeigten sich Myzelbildungen, wo die Hyphenzellen interkalar tonnenförmig angeschwollen waren und die dicht aneinanderliegenden Hyphen zapfenartige Auswüchse und Seitenäste getrieben hatten, die sich übereinander legten, oder umeinander schlangen, so daß eine gedärmeartige Verknäuelung entstand. Aber dabei blieb es. In Wasser trieben die Konidien weit schneller Keimschläuche, als in den obigen Nährlösungen. Und zwar ging die Keimung in der Weise vor sich, daß, wie ich[1]) schon früher bei einer anderen Gelegenheit beschrieben habe, gemeiniglich vom Rücken der sichelförmigen Endzelle ein Keimschlauch hervorsproß, der nach kürzerem oder längerem Verlauf gewöhnlich eine runde Haftscheibe bildete, um danach in der vorherigen Weise weiter zu wachsen. Auch die schnabelförmige Spitze der Endzelle wächst zu einer Art Keimschlauch in Gestalt des vorhin erwähnten stiftförmigen Sporenfortsatzes aus. Sporen, bei denen beide Zellen gleichzeitig Keimschläuche getrieben hatten, kamen nur vereinzelt vor.

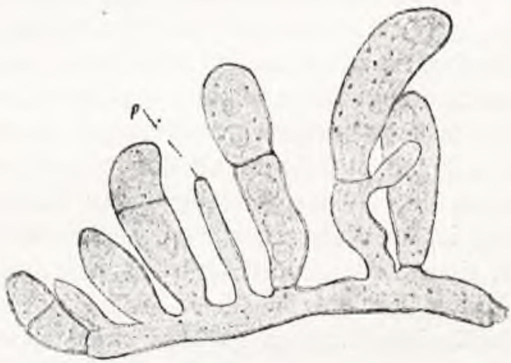


Fig. 4.
Entwickelung der Konidie von Marssonia Potentillae.
p Paraphyse. Vergr. 700.

Während es mir bisher nicht gelungen ist, für den Marssonia-Pilz einen zusagenden künstlichen Nährboden ausfindig zu machen, auf dem sich seine Entwickelung verfolgen ließ, findet man in den Konidienlagern seines natürlichen Substrats, des Blattes, wohl Entwickelungsstufen der Konidien, die erkennen lassen, wie das Anfangsstadium der Spore als ein schmalblätteriges, schwach sichelförmiges Gebilde aus dem Stroma hervortritt (Fig. 4), das sich alsdann im oberen Teile verbreitert, worauf darin zwei Scheidewände erscheinen und der Hyphensprößling zum einzelligen Konidienträger mit der zweizelligen Konidie auswächst. Ebenso gewahrt man auch wohl hin und wieder, daß neben den Konidienträgern

[1]) E. Voges, Pathologische Pilzbildungen. Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. Bd. XXI. 1911. S. 210.

ein schmales, bandförmiges Filament als Paraphysenbildung im Hymenium der Pyknide auftaucht.

Das Fruchtlager von Hendersonia-Arten.

Wie hier Marssonia Potentillae und Gloeosporium nervisequum, ein ähnliches Verhalten zeigen Hendersonia-Formen hinsichtlich der Fruchtlagerbildung. So hat Hendersonia piricola Sacc. auf Birnblättern ein offenes Fruchtlager. Es macht allerdings, mit bloßem Auge oder unter der Lupe betrachtet, den Eindruck, als hätte man eine regelrechte Pyknide vor sich. Aus der gesprengten Epidermis treten nämlich an die freie Blattoberfläche unregelmäßig kegelförmig gestaltete dunkele Fruchtlager mit einer terminalen Spaltöffnung hervor, die auf den ersten Blick als geschlossene Fruchtlager erscheinen und die denn auch in der Systematik fälschlich als Pykniden gelten. Tatsächlich haben wir es jedoch nicht mit echten Pykniden zu tun, sondern mit offenen Fruchtlagern, die allerdings dadurch ein pyknidenartiges Aussehen annehmen, daß die Sporenmasse in einem kraterförmigen Haufen zusammengeballt ist. Diese Anordnung und Lagerung der Sporen ist charakteristisch für Hendersonia. Es ist das ein eigenartiger Wachstumsvorgang des Pilzes. Wie man in den Kulturen auf künstlichen Nährböden erkennt, so erscheinen an einer Stelle des kräftig wachsenden und ausgebreiteten Myzels zuerst einzelne Konidien, zu denen sich dann weitere gesellen, so daß alsbald ein Konidienhäufchen auf dem Myzel lagert, bis schließlich bei der fortschreitenden Sporenproduzierung und Auflagerung der kleine Konidienkrater entstanden ist.

Während unser Blattfleckenpilz nun im Blattgewebe kein geschlossenes Fruchtlager bildet — mir ist wenigstens bisher keine Form bekannt geworden — tritt ein naher Artgenosse, beschrieben unter dem Namen Hendersonia sarmentorum W. im Rindengewebe abgestorbener Achsenorgane, so bei Hedera Helix L., Ribes rubrum L. und Lonicera caprifolium L. mit einer Pyknide auf[1]). Das ist jedoch durchweg

[1]) Die in Rabenhorst-Allescher, Kryptogamenflora VII, 1903, S. 191 als Forma Hederae der Hendersonia sarmentorum aufgeführte Form ist gegenüber den im Rindengewebe des Geisblattes, des Johannisbeerzweiges und der Himbeerruten vorkommenden Formen so abweichend gestaltet, daß sie als besondere Art, wenn nicht Gattung von ihnen abgetrennt werden muß. Bei der Hederae-Form ist der Konidienträger kegelförmig, mehrfach eingeschnürt und bauchig erweitert, sowie zweizellig; bei den anderen Hendersonia-Formen ist der Konidienträger stabförmig und einzellig. Die Konidien der Hederae-Form sind ungleichartig, es besteht ein Pleomorphismus bei ihnen; die Konidien der anderen Formen sind gleichartig; es besteht kein Pleomorphismus. Vgl. E. Voges, Über die Pilzgattung Hendersonia Berk., Bot. Ztg. 68. Jahrg. 1910. S. 87.

auch nicht der Fall. In der Rinde abgestorbener Himbeerruten fand ich im März Hendersonia-Fruchtlager in der gleichen Ausgestaltung wie bei H. piricola. Überhaupt hatte die Rubus-Hendersonia die größte Ähnlichkeit mit H. piricola. Das Hymenium bestand wie bei der letzten Form aus je von einer Konidie gekrönten aufrechten, unverzweigten Konidienträgern und aus fadenförmigen Paraphysen, welche die Konidien überragten. Die tonnenförmigen, vier- bis sechszelligen, typisch indes vierzelligen, an beiden Enden kegelförmig auslaufenden Konidien waren im Jugendzustande hell strohgelb, im ausgereiften bernsteingelb mit dunkelfarbigen Zellmembranen. Der stabförmige, unseptierte Konidienträger hyalin wie die Paraphysen. In den Kulturen auf künstlichen Nährböden wie Agar und Pflaumendekokt, die ich im März und April ansetzte, zeigte der Hendersonia-Pilz ein üppiges Wachstum und bildete die vorhin beschriebenen kraterförmigen Fruchtlager in großer Zahl. Die Sporen wurden auf dem künstlichen Nährboden weit größer, als auf dem natürlichen Substrat. Ihre Gestalt war meist lang birnförmig, an den Enden kegelförmig zulaufend, im ausgebildeten Zustande vier- und mehrzellig. An dem Myzel entstanden im üppigen Wuchs sowohl Konidienträger und Konidien in allen Entwickelungsstadien, erst unseptiert und hyalin, dann mit zunehmender Septenzahl und Gelbfärbung. Die Paraphysen erschienen an den Hyphen in zweierlei, jedoch nicht scharf geschiedenen Formen als knorrige, verzweigte Hyphenäste und pfriemenbis fadenförmige Hyphenaustreibungen. Vereinzelt sah man auch vierzinkige Hyphenäste, wovon der eine Ast eine Konidie trug.

Die systematische Bedeutung der Pyknide.

Schon Bauke[1]) bemerkt, daß die Verbreitung der Pykniden bei den Askomyceten eine sehr unregelmäßige zu sein scheine und inwieweit dieselben für die Systematik der Askomyceten von Wichtigkeit sind, müsse Spezialforschungen überlassen bleiben, wobei der bislang von den Systematikern vernachlässigte Unterschied zwischen echten Pykniden und stromatischen Konidienlagern streng zu berücksichtigen sei. Und gegen die Definition Tulasnes, welcher den Unterschied zwischen Stylosporen oder Pyknosporen und Konidien darin findet, daß erstere in Höhlungen, letztere frei auf einem Stroma oder an einem Myzel entstehen, wendet Bauke mit Recht ein, daß die Stromata meist eine sehr

[1]) Bauke, Beiträge zur Kenntnis der Pykniden I. Verhandlg. der Kaiserl. Leopoldinisch-Carolinisch Deutschen Akademie der Naturf. Bd. 38. Dresden 1876. S. 489.

unregelmäßige Oberfläche mit Vertiefungen und auch mit Höhlenbildungen besäßen, worin die Konidien entständen, die aber doch stets echte Konidien vorstellen und nicht, weil sie in stromatischen Höhlungen entstehen, zu den Stylosporen gerechnet werden dürfen. Anders, wenn ein selbständiger Behälter vorhanden sei mit ein oder mehreren Höhlungen.

Gegen die obige Forderung ist nun in der Systematik derart verstoßen, daß alle Fruchtlager, die bei einer oberflächlichen Betrachtung ein pyknidenartiges Aussehen haben, als Pykniden gelten: sowohl Gehäuse einzig nur aus einem Pilzgeflecht, wie Gehäuse aus Pilzgeflecht plus Substrat und gehäuseartigen Oberflächenbildungen nur aus dem Substrat. Und auf diese unter sich so heterogenen Merkmale hin ist eine der beiden großen Abteilungen der Fungi imperfecti, die Gruppe der Sphaeropsidales, aufgebaut! Aber auch selbst, wenn korrekter und nach gleichwertigem Merkmal in der systematischen Gruppierung der Pilzformen der Fungi imperfecti verfahren wird und die Pyknide in genetisch-anatomischem Sinne als Einteilungsprinzip gilt, so würde man, dies Prinzip bei der Aufstellung und Auseinanderhaltung der Pilzformen zugrunde gelegt, dennoch zu systematischen Widersinnigkeiten gelangen und nahe Verwandte oder gar Artgenossen in ihrer natürlichen Zusammengehörigkeit auseinanderreißen. Denn die Pyknide kann nicht als systematisches Kriterium gelten. Sie ist kein spezifisches Art- oder Gattungsmerkmal, worin der Verwandtschaftsgrad zum Ausdruck kommt. Wie Klebahn[1]) bereits bemerkt, so sei dem Vorhandensein oder Fehlen eines Gehäuses um die Konidienlager in bezug auf die natürliche Verwandtschaft unter Umständen wenig Wert beizulegen, wenigstens nicht so viel, wie es das Saccardosche System tut. Es hat Klebahn[2]) gezeigt, daß die Konidien von Gnomonia veneta auf vier verschiedene Weisen entstehen können, nämlich ganz frei an Hyphen, so allerdings nur in Reinkulturen, zweitens zu Lagern ohne Gehäuse vereinigt, so auf den Blättern als Gloeosporium nervisequum und G. Platani, drittens in Lagern mit wenig ausgeprägtem Gehäuse, so als Myxosporium valsoideum oder Discula Platani in der Rinde der Zweige und viertens in einem unverkennbar schwarzen, mitunter mehrkammerigen Gehäuse, so als Sporonema Platani oder Fusicoccum veronenoe auf toten Blättern.

---

[1]) Klebahn, Zeitschr. f. Pflzkrankh. Jahrg. 1908. S. 147.

[2]) Klebahn, Untersuchungen über einige Fungi imperfecti usw. Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 41. 1905. S. 558.

Und wie wir vorhin sahen, so erscheint Marssonia Potentillae, also ein und derselbe Pilz, einmal unter einer Gestalt mit offenem Konidienlager, das andere Mal unter der Gestalt mit geschlossenem Konidienlager als Pyknide. Der Pilz in der ersten Gestaltung wäre also eine Melanconiales-Form und der Pilz in der Pyknidengestalt eine Sphaeropsidales-Form. Tatsächlich aber haben wir es in beiden Fällen mit einem und demselben Pilze zu tun. Und bei den Hendersonia-Arten müßten nach dem Saccardoschen Systeme die einen zu den Melanconiales, die anderen zu den Sphaeropsidales gestellt werden, in verschiedene Ordnungen, obwohl es Artgenossen sind. So würden nahe verwandte Formen auf ein Merkmal hin, nur weil die eine oder andere Form eine Pyknide bildet, künstlich getrennt im System, während dieses doch gerade die natürliche Verwandtschaft zum Ausdruck bringen soll!

Aber, so wird man fragen, welche Merkmale hätten denn für die Klassifikation der Fungi imperfecti maßgebend zu sein, wenn nicht ein so charakteristisches Kennzeichen, wie es die Pyknide doch ist? Eine einzelne Eigenschaft des Organismus, mag sie auch noch so auffällig vor allen anderen hervortreten, kann nicht für dessen Stellung im System bestimmend sein. Nur die Summe jener Eigenschaften, woraus sich eben die Wesenheit der Art und des Individuums zusammensetzt in ihrer Totalität, der Gesamthabitus der jeweiligen Pilzform ist maßgebend für die Einreihung im System.

Es ist nun neuerdings von A. Potebnia[1]) und vornehmlich von v. Höhnel[2]) die Fruchtlagerbildung, insonderheit die Pyknidenausbildung als Einteilungsprinzip für die Gruppe der Fungi imperfecti verwandt worden. Wie indes v. Höhnel selbst sagt, kann das Gebotene vorläufig nur als ein Versuch gelten. — Wenn auch in die Pilzrumpelkammer der Fungi imperfecti nur schwer eine genealogische Ordnung zu bringen ist, da wir es ja nicht mit ausgebildeten Pilzformen, sondern meist mit Entwicklungsstadien zu tun haben, so ist doch jeder Versuch zu begrüßen, der eine Verbesserung des Saccardoschen Systems bedeutet. Aber über die Grundprinzipien der Klassifikation und über die morphogenetische Wertung der systematischen Charaktere sollte man sich verständigen. So vor allem über den Charakter der Pyknide. Haben wir es bisher in der Systematik, wie wir vorhin sahen, in der Pyknide nicht mit einem ein-

[1]) Potebnia, Beiträge zur Micromycetenflora Mittel-Rußlands. Annal. mycol. 1910. S. 58. — Ein neuer Krebserreger des Apfelbaumes usw. Z. f. Pflk. 1912. S. 140.

[2]) v. Höhnel, Zur Systematik der Sphaeropsideen und Melanconieen. Ann. mycol. 1911. S. 258.

heitlichen morphologischen Gebilde zu tun, so heißt es doch in das entgegengesetzte Extrem verfallen, wenn A. Potebnia der Septoriagattung die echte Pyknide abspricht. Zu seiner Gruppe der Pseudopycnidiales, welche „freie Konidienlager mit erhabenem Rande“ haben und deren meist zartwandige Fruchtkörper aus einem Gewebe von Hyphen bestehe, „welches den Hohlraum, der in dem Blattgewebe durch die zerstörende Tätigkeit des Pilzes entstanden ist, umgibt“, stellt Potebnia die Gattung Septoria, zumal S. nigerrima Fuck. = S. piricola Desm. Tatsächlich aber haben die Septoriaformen, vor allem S. Apii Br. et Car. wohlentwickelte echte Pykniden. Wenn bei S. piricola auch die Pyknidenwandung lockergewebig ist, so treffen doch auf diese Form alle Gattungskriterien zu, wie die selbständige Gehäusebildung des Myzels auf dem natürlichen wie dem künstlichen Substrat in der Kultur in Gestalt einer kugeligen bis kreiselförmigen Pyknide mit terminaler Porusmündung, para- oder prosoplectenchymatischem Hyphengewebe und Konidienhymenium mit kleinen, kurzen, kegelartigen oder flaschenförmigen Konidienträgern und langen stab- oder fadenförmigen, gekrümmten mehrzelligen Pyknosporen. Wenn Potebnia ferner sagt, daß bei S. piricola „das Gehäuse nicht wie bei den echten Pykniden aus pseudoparenchymatischem (paraplectenchymatischem) Gewebe bestehe, sondern nur aus miteinander verflochtenen Hyphen (einem Prosoplectenchym) bestehe, so kann eine paraplectenchymatische Hyphenverflechtung als bezeichnend für die echte Pyknidenbildung nicht gut gelten, da einmal keine erkennbaren Grenzen zwischen para- und prosoplectenchymatischem Gewebe bestehen und zum anderen in ein und derselben Pyknide zumeist beide Arten der Hyphenverflechtung vorkommen. Ebensowenig ist die Hyphenauskleidung des Hohlraums, der „durch die zerstörende Tätigkeit des Pilzes entstanden ist“, ein Charakteristikum für die „Pseudopyknide“, da ja auch die echten Pykniden solche Hohlräume im Blattgewebe auskleiden.

Zu den echten Pyknidales, den „Formen mit symphyogen oder meristogen entstandenen Pykniden“ zählt Potebnia auch die Gattung Hendersonia. Allein, H. piricola Sacc. auf Birnblättern und eine dieser gleichende Hendersonia-Form auf Rosenblättern sowie H. sarmentorum West. auf abgestorbenen Himbeerstengeln und noch andere Formen haben jedoch gar keine Pykniden, obwohl sie sonst alle Gattungscharaktere der Hendersonia besitzen. Sie sind also eher echte Melanconiales. Andererseits stellt Potebnia neben Septoria die Gattung Vermicularia zu seinen Pseudopyknidales, während beispielsweise die weitverbreitete V. trichella Fr., auf den Epheublättern eine ausgesprochene Melanconiee ist.

An diesen wenigen Beispielen zeigt sich schon, welche Kontroversen die Klassifikation der Fungi imperfecti mit sich bringt. Jedenfalls aber wären als Pseudopykniden nur jene gehäuseartigen Bildungen zu bezeichnen, die nicht als selbständige, symphyogen oder meristogen entstandene para- oder prosoplectenchymatische Gehäusebildungen des Myzels sich ausweisen.

Indem v. Höhnel[1]) den Begriff der Pyknide mit Recht weiter und zutreffender, als Potebnia faßt, versteht er unter Pycnidiaceae alle jene Formen, „die mehr minder typische Pykniden besitzen, deren Konidienträger nicht auf die Basis derselben beschränkt sind". Und zu den Pseudosphaerioideae, seiner Unterabteilung der Melanconiaceae, rechnet er die Formen mit pyknidenähnlichen Fruchtkörpern, aber ohne deutliche eigene Wandung.

Die biologische Bedeutung der Pyknide.

Über das Wesen der Pyknide äußert Bauke: Obgleich die Pykniden in ihrer Eigenschaft als ungeschlechtliche Fortpflanzungsorgane von Askomyceten neben die Konidien zu stellen sind, so sind sie doch von letzteren in Hinsicht auf die Entwickelungsgeschichte prinzipiell verschieden. Während die Konidien entweder direkt an freien Myzelfäden abgeschnürt werden, oder an stromatischen Lagern von unregelmäßig schwankender Form ihren Ursprung nehmen, erweisen sich dagegen die Pykniden von Anfang an als deutlich individualisierte Gebilde.

Gegenüber dieser Auffassung, daß die Pykniden als ungeschlechtliche Fortpflanzungsorgane hinsichtlich ihrer Entwickelung prinzipiell von den Konidien verschieden und individualisierte Bildungen seien, ist geltend zu machen, daß nicht Pyknide und Konidie die Vergleichungsobjekte sind, sondern das offene und das geschlossene Fruchtlager bezw. Hymenium der bezüglichen Pilze. Und aus dieser vergleichend anatomischen Betrachtungsweise ergibt sich, daß die Konidien im offenen und die Stylosporen oder Pyknosporen im geschlossenen Fruchtlager gleichwertige Bildungen sind als ungeschlechtliche Fortpflanzungskörper. Die Pyknide aber ist nichts weiter als eine besondere Ausgestaltung des Stroma in Form eines Gehäuses, das schützend das Hymenium umgibt.

Wie das Myzel der Pilze zu einer bestimmten Zeit derbwandiger und gelbfarbig wird, wie es zur Bildung von Chlamydosporen und Dauer-

[1]) v. Höhnel, a. a. O. S. 260.

myzel kommt, so vermag auch der Pilzorganismus, wie wir das bei Marssonia Potentillae sahen, unter gewissen Umständen von einem offenen zu einem geschlossenen Fruchtlager überzugehen und eine Pyknide zu bilden. Schon aus dieser Tatsache, daß ein und derselbe Pilz eine solche Wandlung mit seinem Fruchtstand vornehmen kann, ergibt sich, daß die Pyknide nicht den spezifisch morphogenetischen Wert als Fortpflanzungskörper hat, den ihr Bauke beilegt.

Dieselbe Schutzhüllenbedeutung wie die Pyknide für das Konidienhymenium hat das Perithecium für die Askusfruchtschicht. Und da ist es denn interessant, wie beiderlei Schutzgehäuse die gleichen Gestaltsbildungen aufweisen. So haben Pykniden wie Perithecien auf ihrer äußeren Wandoberfläche gleich gestaltete Borstenbildungen und an der inneren Gehäusewandung ähnliche Paraphysen. Ebenso sind die Mündungen der beiden Gehäusearten oft ganz gleichartig gebaut, was sich selbst auf einen röhrenförmig ausgezogenen Halsteil erstreckt, der bei den Perithecien der Gnomoniaceen und den Pykniden der Sphaeronema-Arten beinah die gleiche Gestaltung hat.

Wenn indes Bauke[1]) aus dem Umstande, daß die Pykniden sich bis zu dem Beginn der Stylosporenbildung wesentlich in gleicher Weise entwickeln wie die Perithecien, eine genetische Verwandtschaft zwischen den beiden Fruktifikationsformen ableiten möchte und mit Pringsheim in den Pykniden die neutrale Fruchtform der Askomyceten erblickt, indem er Pykniden und Perithecien als Wechselgeneration betrachtet, so ist das insofern auch nicht ganz zutreffend, als hierbei nicht die Pyknide und das Perithecium, diese Gehäusebildungen, das Wesentliche bei dem Generationswechsel sind. sondern allgemein die Konidienform und die Askusform. Sie sind es, die im Entwickelungszyklus der Askomyceten, einerlei, ob in dem Kreislauf des Pilzes eine Pyknide gebildet wird oder nicht, die Wechselgeneration abgeben als ungeschlechtliche und geschlechtliche Generationsfolge.

Schlußbetrachtungen.

Aus unseren bisherigen Darlegungen erhellt, daß entgegen den früheren Anschauungen die Pyknide als Fruchtform der Askomyceten nicht die Rolle spielt, die man ihr in systematischer und in morphogenetischer Beziehung zugewiesen hat. In erster Linie hat sie eine

---

[1]) Bauke, Zur Entwickelungsgeschichte der Ascomyceten. Botan. Zeitung. 35. Jahrg. 1877. S. 313 ff.

biologische Bedeutung, wie das auch schon anderweitig mehrfach ausgesprochen wurde. Sie stellt wie das Perithecium im Leben der Askomycetenpilze ein der veränderten Lebensweise zugrunde liegendes Anpassungsgebilde dar, insonderheit eine Schutzgewebsbildung für die Generationsorgane. Eine Dauerform, welche dem wechselnden Verhalten der Wirtspflanze insofern Rechnung trägt, als deren Pilzbewohner nicht mit dem Absterben des Wirts, den er unter einer anderen gestaltlichen Ausbildung und Organisation heimsuchte, nun ebenfalls zugrunde geht, sondern, führte er bis dahin wie unsere Marssonia in dem lebenden Blattgewebe eine parasitische Lebensweise, nunmehr in dem abgestorbenen Blatte zur saprophytischen übergeht, die sodann für die Perithecienform typisch ist. So stehen denn vielfach die Dauermyzel- sowie Schutzhüllenbildung und die saprophytische Lebensweise in einer gewissen Wechselbeziehung wie die freie Fruchtlagerbildung und die parasitäre Lebensweise. Allerdings ist damit nicht gesagt, daß der Pyknidenpilz allemal gleichbedeutend mit Saprophyt sei. Wir zählen vielmehr Pyknidenpilze zu unseren ausgesprochensten Parasiten, so beispielsweise Septoria- und Phyllostictaformen, die alsdann wie Marssonia zugleich Parasit und Saprophyt sind. Es tritt dabei nun die interessante Erscheinung hervor, daß Pilzformen, welchen das Perithecienstadium abgeht, in der Pyknidenform in dem abgestorbenen Nährwirt überwintern, während bei Pilzformen mit Pykniden- und mit Perithecium-stadium das erstere im Laufe des Winters meist wohl zugrunde geht und das Askusstadium die Erhaltung der Art übernimmt. So ist es, abgesehen von Marssonia Potentillae, bei Septoria Apii Br. et Cav. und Septoria nigerrima Sacc. und, worauf Potebnia aufmerksam macht, bei Septoria Cholidonium. Der Pyknidenpilz S. Apii auf der Selleriepflanze entbehrt der Askusform. Wenigstens ist es Klebahn nicht und ebensowenig mir gelungen, ihn ausfindig zu machen. Der Pilz überwintert nun auf den abgestorbenen Blättern und seine Pyknosporen sind im Frühjahr keimungsfähig, was bereits Klebahn[1]) nachgewiesen hat und ich bestätigen kann.

So erscheint denn ein Dauerzustand des Pilzes unter den ungleichen Gestaltungen des Myzels als Stroma, Sklerotium, Pyknide und Perithecium. Sie sind Hyphengebilde, welche in biologischer Hinsicht ein und demselben Zwecke dienen: dem Pilze in seinen verschiedenen Lebensabschnitten, während der Ruhe- und während der Vegetationszeit eine

---

[1]) Klebahn, Krankheiten des Selleries. Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. Bd. XX. 1910. S. 13.

Schutzlager- und Entwickelungsstätte zu bieten. Und diesen Aufgaben entsprechend wechselt das Stroma seine Struktur und Funktion. So tritt es bei Marssonia Potentillae einmal als zartwandiges, blasses Hyphengeflecht mit einer offen liegenden Fruchtschicht auf, das andere Mal im Ruhe- und Dauerzustand des Pilzes als derbwandiges, gelbfarbiges geschlossenes Fruchtlager unter der Gestalt der Pyknide. Und ähnlich ist es bei unserer Hendersonia-Form in der Rinde der abgestorbenen Himbeerachse, wie sich das in der Kultur zeigte. Während, wie vorhin geschildert, anfangs in den Hendersonia-Kulturen die blaßfarbigen Konidien und Paraphysen frei an den Hyphen des locker verflochtenen Myzels entstanden, vereinigt in kleineren oder größeren Fruchthäufchen, so erscheinen späterhin, nach einigen Wochen in der Oberschicht des Substrats große kugelförmige und pyknidenähnliche gelbfarbige Fruchtkörper aus dicht verflochtenen Hyphen, so daß schließlich zweierlei Fruchtkörper in der Kultur vorkommen: die schwarzen kraterförmigen Sporenhaufen und jene gelben Fruchtkörper pyknidenähnlichen Charakters. Sie bestehen, wie senkrechte Durchschnitte lehrten, aus einer kompakten, dicht verfilzten Myzelmasse. Eine schmale Randzone besteht aus großkaliberigen und dunkeler gefärbten Hyphen. Eine gleiche, aber breitere ringförmige Pilzgewebszone liegt im zentralen Teile des Fruchtkörpers. Von ihr gehen nach der Peripherie strahlenförmig Hyphenstränge mit vereinzelten und unregelmäßig verteilten Konidien aus. Der Aufbau dieser Pilzgewebskörper wird uns klarer, wenn wir deren erste Anfänge auf dem Substrate verfolgen. Da zeigt sich denn, daß in dem locker verflochtenen Myzel an irgend einer Stelle, wo an den Hyphen eine Anzahl Konidienträger mit Konidien entstanden sind, eine stärkere Verfilzung der Hyphen unter gleichzeitiger Zunahme der Konidienbildung vor sich geht. Die Konidien liegen, um ein Bild zu gebrauchen, an solchen Stellen wie ein Bündel zusammengeraffter Ähren. Indem alsdann das Hyphenwachstum und die Verfilzung fortschreiten, wobei zugleich eine Schleimbildung sich geltend macht, entsteht schließlich der pyknidenähnliche Fruchtkörper, der sich von dem kegelförmigen schwarzen Konidienlager der Hendersonia nur dadurch unterscheidet, daß bei ihm das vegetative Wachstum das fruktifikative überholte, so daß seine Masse vorzugsweise aus dicht verflochtenen Hyphen, von Konidien durchsetzt, besteht, während bei den schwarzfarbigen Fruchtkörpern es umgekehrt ist und die Hauptmasse aus Sporen besteht. Jedenfalls sind es eigentümliche Stromabildungen, deren Schicksal ich noch weiter verfolgen werde in den im März angesetzten Kulturen.

Wie das ausgebildete pseudoparenchymatische Pilzgewebe des Perithecium und der Pyknide einander gleicht, so ist auch die erste Anlage dieser Fruchtkörper fast gleichartig in der Hyphenverflechtung meristogener oder symphyogener Art zu einem Gewebekörper, worauf schon Bauke[1]) hinweist. Und eigentümlich ist dabei die Erscheinung, daß selbst da, wo der Pilz unter natürlichen Verhältnissen keine Pyknide bildet, in den Kulturen auf künstlichen Nährböden, so bei Hendersonia piricola, die in der Natur ein offenes Konidienlager besitzt, gewisse Hyphenbildungen erscheinen, die man als die ersten Stadien der Pyknidenbildung ansprechen muß. Ebenso bei H. sarmentorum auf der Himbeerrute. Die Pyknidenanlage ging in der Weise vor sich, daß bei einer oder bei mehreren, alsdann dicht aneinanderlagernden großkaliberigen Hyphen interkalar mehrere Zellen kugelig oder tonnenförmig anschwollen. Dasselbe vollzog sich an den Zellen der aus jenen tonnenförmigen Gliedern hervorgegangenen kleinkaliberigen Hyphenzweigen, so daß es zur Bildung eines traubigen Gewebekörpers kam. Oder es bildete eine große Hyphe eine Schlinge, deren Windungen die traubigen Anschwellungen hatten. Und aus den kugeligen Gliedern der eingerollten Hyphe entsprangen ebenfalls kleinkaliberige Hyphenzweige, welche die große Hyphe umschlangen, so daß eine Verknäuelung entstand. Indem sich ferner mehrere Hyphen mit ihrem kugeligen Zellenstück nebeneinander legten und durch den Druck gegenseitig abplatteten, wurden die Zellen polyedrisch und es entstand so ein pseudoparenchymatisches Gewebe. Aber eine echte Pyknide kam nicht zustande. Es blieb bei den Verknäuelungen. Oder man sieht die vorhin beschriebenen großen gelben Fruchtkörper entstehen. Eine meristogene Entstehungsweise der Pyknidenanlage in den Kulturen der Hendersonia-Pilze durch allmähliche Teilung von Zellen eines interkalaren Hyphenstücks nach allen Richtungen und Wachstum sowie Differenzierung habe ich nicht beobachtet.

Die Schlingenbildung und Einrollung der Hyphen als ein erstes Stadium der Pyknidenbildung kommt bei den Askomyceten-Pilzen in weiter Verbreitung vor. So bemerkt auch Bauke[2]) über die Pyknidenanlage von Leptosphaeria doliolum: „In einer durch mehrfache Einrollung eines Myzelfadens entstandenen Schlinge erblickt man einen parenchymatischen Zellkörper: die junge Anlage einer Pyknide.

[1]) Bauke, Bot. Ztg. 1877. S. 313ff.

[2]) Bauke, Verhandlg. d. Kaiserl. Leopoldinisch-Carolinisch. Deutschen Akademie der Naturf. 1876.

Wir sehen also bei den verschiedenen Fruchtkörperbildungen wie Perithecium, Pyknide und den Fruchtlagern bestimmter Hendersonia-Formen, daß ihre ersten Anlagen in den meristogenen oder symphyogenen Hyphenbildungen gleichartig sind. Weiterhin tritt dann in dem einen Falle ein Stillstand in der Entwickelung ein. Ein pseudoparenchymatischer Pilzgewebskörper ist zwar entstanden, aber auf diesem Stadium verharrt der Pilzorganismus, der auf seinem natürlichen Substrate ein offenes Fruchtlager bildet. In dem anderen Falle schreitet die Differenzierung der gleichartigen Anlage wie jene weiter fort: es entsteht als echte Pyknide ein von dem Konidienhymenium ausgekleidetes Gehäuse. Und geht die Differenzierung noch weiter unter komplizierten sexuellen Vorgängen, so entwickelt sich aus dem Myzel als Perithecium ein Gehäuse, ausgekleidet mit der Askusfruchtschicht.

Worauf die merkwürdige Erscheinung zurückzuführen ist, daß bei den einen Pilzen die Pyknidenanlagen im unentwickelten Zustande verharren, eine Weiterdifferenzierung unterbleibt, dafür kämen vielleicht phylogenetische Gesichtspunkte in Frage, die uns jedoch zu gewagten Spekulationen führen würden.

Die Zersetzung von Harnstoff, Harnsäure, Hippursäure und Glykokoll durch Schimmelpilze.

2. Mitteilung.

Von **Alexander Kossowicz.**

In einer früheren Arbeit[1]) wurde nachgewiesen, daß von zehn daraufhin geprüften Pilzen alle zehn imstande waren Harnstoff und Harnsäure unter Ammoniakbildung zu assimilieren, neun zur Assimilation von Glykokoll unter Ammoniakbildung befähigt waren, nur sechs die Hippursäure assimilieren und unter Ammoniakbildung zersetzen konnten; Cladosporium herbarum zeigte nach längerer Versuchsdauer keine befriedigende Entwicklung in den damals verwendeten glykokollhaltigen Nährlösungen, Pencillium crustaceum, Penicillium brevicaule, Aspergillus glaucus und Cladosporium herbarum in den hippursäurehaltigen Nährlösungen.

Es schien nun von Interesse, zu untersuchen, ob bei entsprechender Vorzucht und wesentlicher Änderung der Ernährungsbedingungen nicht auch diese Pilze zur Assimilation von Glykokoll und Hippursäure herangezogen werden könnten. Allerdings hatte Cladosporium herbarum schon in meinen Versuchen[2]), die sich auf die enzymatische Spaltung von Harnsäure und Hippursäure bezogen, ein gegenüber den anderen Pilzen recht abweichendes Verhalten zur Hippursäure gezeigt.

Es wurden die vier unten genannten Pilze zunächst in einer Nährlösung herangezüchtet, die auf 1000 ccm destilliertes Wasser, 20 g Dextrose, 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, 4 g Harnstoff, 1 g Hippursäure und 1 g Glykokoll enthielt, und nachdem die Zuchten gut entwickelt waren (Versuchsdauer acht Tage, Temperatur 20° C) in eine glykokollhaltige

[1]) Alexander Kossowicz, diese Zeitschrift, Bd. 1, 1912, S. 60.

[2]) Alexander Kossowicz, diese Zeitschrift, Bd. 1, 1912, S. 121 und S. 316.

Mannitnährlösung und in eine glykokollhaltige Dextrosenährlösung, ferner in eine hippursäurehaltige Mannitlösung und in eine hippursäurehaltige Dextrosenährlösung eingeimpft, wobei ein sehr kleines Stück des Myzels samt den Sporen (Konidien) übertragen wurde. Die Nährlösungen hatten die folgende Zusammensetzung:

1. Glykokoll-Mannit-Nährlösung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 2 g Glykokoll, 10 g Mannit, 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, eine Spur $CaCO_3$ und $FeCl_3$.

2. Glykokoll-Dextrose-Nährlösung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 2 g Glykokoll, 10 g Dextrose, 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, eine Spur $CaCO_3$ und $FeCl_3$.

3. Hippursäure-Mannit-Nährlösung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 2 g Hippursäure, 10 g Mannit, 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, eine Spur $CaCO_3$ und $FeCl_3$.

4. Hippursäure-Dextrose-Nährlösung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 2 g Hippursäure, 10 g Dextrose, 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, eine Spur $CaCO_3$ und $FeCl_3$.

In diesen Nährlösungen kamen alle vier Pilze (Penic. crustaceum, Pen. brevicaule, Aspergillus glaucus und Cladosporium herbarum) innerhalb acht Tagen bei einer Versuchstemperatur von 20° C zu einer guten Entwicklung, die nur bei Cladosporium herbarum in den beiden Hippursäure-Nährlösungen eine schwächere war. Im allgemeinen war auch die Entwicklung der Pilze in den Dextrose-Nährlösungen eine weit bessere als in den Mannit-Nährlösungen. Auch diese vier Pilze waren also imstande Hippursäure und Glykokoll als Stickstoffquelle zu verwenden. Bei Penicillium crustaceum, Penicillium brevicaule und Aspergillus glaucus konnte deutliche kräftige Ammoniakbildung in allen glykokoll- und hippursäurehaltigen Nährlösungen nachgewiesen werden, während Cladosporium herbarum nur in den glykokollhaltigen Nährlösungen kräftige Ammoniakbildung zeigte; in der Hippursäure-Mannit-Nährlösung konnte nur eine schwache Verfärbung des Nesslerschen Reagens durch die Cladosporiumzucht bemerkt werden.

Aus den hier und früher mitgeteilten Versuchen ergibt sich, daß alle von mir geprüften Pilze, d. s. Botrytis Bassiana, Penicillium crustaceum (glaucum), Mucor γ Boidin, Cladosporium herbarum, Phytophthora infestans, Penicillium brevicaule, Aspergillus glaucus, Aspergillus niger, Isaria farinosa und Fusisporium,

Harnstoff und Harnsäure und unter entsprechenden Versuchsbedingungen auch Glykokoll und Hippursäure als Stickstoffquelle ausnutzen können. Diese Fähigkeit, die schon Czapek[1]) für Aspergillus niger festgestellt hat, wurde kürzlich auch von Puriewitsch[2]) für den gleichen Pilz wieder nachgewiesen.

Da auch mit der Aufnahme des freien Luftstickstoffs gerechnet werden mußte, wurden Kontrollversuche mit den gleichen Nährlösungen ohne Stickstoffquellen ausgeführt, in denen es aber höchstens zu geringfügigen Flockenbildungen kam.

Wie ich weiter finden konnte, sind einige von den erwähnten 10 Pilzen auch imstande, Harnsäure (z. B. Aspergillus glaucus, Isaria farinosa, Penicillium glaucum, Mucor Boidin, Phytophthora, Botrytis Bassiana), Hippursäure (z. B. Penicillium glaucum, Aspergillus niger, Aspergillus glaucus, Isaria farinosa, Botrytis Bassiana, Phytophthora, Cladosporium, Fusisporium) und Glykokoll (z. B. Penicillium glaucum, Botrytis Bassiana, Isaria farinosa, Phytophthora, Cladosporium, Fusisporium, Aspergillus niger, Aspergillus glaucus, Mucor Boidin) als gemeinsame alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu verwerten. Näheres hierüber und über das Verhalten der zehn Pilze zu Guanin und Guanidin und das Verhalten von Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen zu Chitin wird eine spätere Mitteilung bringen. Nach Nägeli und Loew[3]) ist der Harnstoff wohl eine gute Stickstoffquelle für Pilze, kann ihnen aber nicht als Kohlenstoffquelle dienen. Diakonow[4]) hat die Verwendbarkeit des Harnstoffs als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle für Penicillium geprüft. Nach Raciborski[5]) ist Hippursäure für Penicillium Poiraulti, nicht aber für Basidiobolus ranarum eine gute gemeinsame Stickstoff- und Kohlenstoffquelle. Ebenso fand Went[6]), daß Monilia sitophila Glykokoll als alleinige Stickstoff- und Kohlenstoffquelle, Harnstoff und Hippursäure nur als Stickstoffquellen auszunutzen vermag. Die Verwendbarkeit von Harnstoff, Harnsäure und Glykokoll als ge-

[1]) F. Czapek, Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie, Bd. 1, 1902, S. 538, Bd. 2, 1902, S. 580.

[2]) K. Puriewitsch, Biochemische Zeitschrift, Bd. 38, 1912, S. 477.

[3]) Nägeli und Loew, Sitzungsb. d. kgl. Akad. München, math.-phys. Kl., 10, 1880, S. 277.

[4]) N. W. Diakonow, Ber. d. deutsch. bot. Gesellsch., Bd. 5, 1887, S. 385.

[5]) M. v. Raciborski, Flora, 1896, Bd. 82, S. 107.

[6]) F. C. Went, Ber. d. deutschen bot. Gesellsch. 1896, Bd. 16, S. 158.

meinsame Stickstoff- und Kohlenstoffquelle für die Ernährung von Saprolegnia mixta hat Klebs[1]) betont. Eine Entwicklung von Asp. niger bei Darbietung von Hippursäure als Kohlenstoffquelle und ebenso als Stickstoffquelle beobachtete J. Nikitinsky[2]). O. Emmerling[3]) hat das Wachstum einiger Pilze im hohlen Objektträger (feuchte Kammer) bei Darbietung von Glykokoll und anderer Aminosäuren als alleiniger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle wahrgenommen und zwar zeigten Pen. glaucum und Asp. Oryzae sehr kräftige, Asperg. niger, A. clavatus und Mucor Mucedo spärliche Entwicklung in glykokollhaltiger Nährlösung.

Bemerken möchte ich noch, daß Harnstoff von vielen Forschern gelegentlich verschiedener Untersuchungen als Stickstoffquelle für Pilze Verwendung fand, wobei aber nur die Assimilation nicht aber die Art der Zersetzung berücksichtigt wurde, so z. B. auch von Linossier und Roux[4]), Wehmer[5]), Namyslowski[6]) u. A.[7]).

Auch Hagem[8]) hat eigentlich nur die Verwendbarkeit von Harnstoff, Harnsäure und Hippursäure als Stickstoffquelle und Glykokoll als Stickstoffquelle und Kohlenstoffquelle für Mucorineen nachgewiesen, da der Ammoniaknachweis mit Hilfe des Nesslerschen Reagens, wie ich dies schon früher betont habe[9]) in seinen dextrosehaltigen Nährlösungen bei den drei ersten Verbindungen nicht beweiskräftig erscheint.

Angesichts des Umstandes, daß gewisse Schimmelpilze unter veränderten Versuchsbedingungen dazu veranlaßt werden können, alle vier eingangs erwähnten Verbindungen zu assimilieren, ergibt sich die Frage, ob diese Erscheinung nicht auch bei Bakterien zutrifft. Leider sind die Schellmannschen Bakterien[10]) nicht mehr erhältlich, so daß eine Nachprüfung nicht stattfinden kann, auch sind von den von Schellmann

---

[1]) G. Klebs, Jahrb. f. wissensch. Botanik, Bd. 33, 1899, S. 513.

[2]) J. Nikitinsky, Jahrb. f. wissensch. Botanik, Bd. 44, 1904, S. 1.

[3]) O. Emmerling, Ber. d. deutschen chem. Gesellschaft, Bd. 35, 1902, S. 2289.

[4]) Linossier und Roux, Arch. de med. exper. t. 2, 1890, S. 62.

[5]) C. Wehmer, Botanische Zeitung, Bd. 49, 1891, S. 233.

[6]) B. Namyslowski, Anzeiger der Akademie der Wissenschaften in Krakau, Serie B. 1910, S. 477.

[7]) S. auch die Ausführungen W. Beneckes in Lafars Handbuch der Techn. Mykologie, Bd. 1, 1905, S. 401 f. und W. Kruse, Allgem. Mikrobiologie, 1910, S. 108 f.

[8]) O. Hagem, Videnskabs-Selskabets Skrifter, I, math. nat. Kl. 1910. No. 4.

[9]) Al. Kossowicz, diese Zeitschrift, Bd. 1, 1912, S. 319.

[10]) W. Schellmann, Über hippursäurezersetzende Bakterien. Dissertation Göttingen, 1902.

isolierten 25 Hippursäure-, 5 Harnstoff- und 4 Harnsäurebakterien nur fünf, darunter drei die Harnstoff, Harnsäure und Hippursäure, zwei die bloß Hippursäure assimilieren, näher beschrieben worden, so daß die ganzen Untersuchungen zu diesem Zwecke vom Grunde aus neu aufgenommen werden müßten[1]).

Nitritassimilation durch Schimmelpilze.

1. Mitteilung.

Von **Alexander Kossowicz.**

Raulin[2]) sieht Nitrite für die Ernährung des Aspergillus als minderwertig bezw. ungeeignet an. K. Wolf[3]) konnte feststellen, daß Mucor Mucedo Nitrat zu Nitrit reduziert und daß bei Eintritt einer kräftigen alkoholischen Gärung auch die salpetrige Säure verschwindet. Winogradsky und Omeliansky[4]) bemerkten in Nitritlösungen die Entwicklung eines nitritassimilierenden Schimmelpilzes. Treboux[5]) gab in einer im Jahre 1904 erschienenen vorläufigen Mitteilung über die Stickstoffernährung der grünen Pflanzen ganz allgemein und nur so nebenbei, ohne Nennung der betreffenden Pilze und der gebrauchten Nährlösungen an, daß Nitrite auch für Pilze bei alkalischer Reaktion der Nährlösung meist eine gute Stickstoffquelle sind, während saure Lösungen durch Freimachung der stark giftigen salpetrigen Säure tödlich wirken. Raciborski[6]) konnte Nitritassimilation ohne Ammoniakbildung durch eine von ihm isolierte Cylindrotrichum-Art beobachten. Aspergillus niger, dessen Verhalten zu Nitriten von Raciborski gleichfalls geprüft wurde, zeigte in den von ihm zur Anwendung gebrachten Saccharose-Nitrit-

[1]) S. auch F. Löhnis, Fortschritte der landw. Bakteriologie II, diese Zeitschrift, Bd. 1, 1912, S. 342.

[2]) Raulin, Nach W. Benecke in Lafars Handbuch der Technischen Mykologie, Bd. 1, 1905, S. 404.

[3]) K. Wolf, Hygienische Rundschau, Bd. 9, 1899, S. 546.

[4]) Winogradsky und Omeliansky, Centralbl. f. Bakteriologie, 2. Abt. Bd. 5, 1899, S. 329.

[5]) O. Treboux, Berichte der Deutschen botan. Gesellschaft, Bd. 22, 1904, S. 570.

[6]) M. Raciborski, Anzeiger der Akademie der Wissenschaften in Krakau, math. nat. Kl. 1906, S. 733.

lösungen eine sehr schlechte Entwicklung. Während eine Reihe von Mucorineen in Hagems[1]) Versuchen in Nitritlösungen nur ein äußerst spärliches Wachstum aufwiesen, kamen andere und zwar Mucor racemosus, M. Christianensis, M. sphaerosporus, M. griseo-cyanus, M. genevensis, M. 179a, M. 174a, M. spinosus und M. circinelloides zu einer sehr guten Entwicklung und Fruktifikation. Hagem glaubte bei den einzelnen Mucorineen eine bald stärkere, bald schwächere Ammoniakreaktion mit Hilfe des Nesslerschen Reagens nachweisen zu können. Nachdem aber Hagem dextrosehaltige Nährlösungen verwendet hat, ist diese Feststellung, wie ich schon bei anderer Gelegenheit[2]) hervorgehoben habe, nicht beweiskräftig. Nach Ritter[3]) wachsen Cladosporium herbarum, Mucor racemosus und Mucor spinosus gut auf einer 0,7 % $NaNO_2$ haltigen Traubenzuckerlösung mit den erforderlichen Mineralsalzen. Ritter macht hierüber in seiner Abhandlung nur diese hier mitgeteilte kurze Angabe ohne Bekanntgabe der durchgeführten Versuche.

Da bisher eigentlich nur über Mucorineen nähere Untersuchungen hinsichtlich ihres Verhaltens zu Nitriten vorliegen und bezüglich der Art der Nitritassimilation Widersprüche herrschen, wurden von mir Untersuchungen über die Nitritassimilation durch Schimmelpilze wieder aufgenommen. Von den zahlreichen Versuchsreihen, die von mir ausgeführt wurden, sollen hier nur einige näher erwähnt werden. Meinen Schülern, den Herren Ingenieur-Chemiker Otto Fessler, Militär-Unterintendanten Leopold von Gröller und Josef Hanisch und cand. chem. Walter Loew, die mir bei der Herstellung einzelner Nährlösungen und Durchführung einiger Untersuchungen behilflich waren, danke ich auch an dieser Stelle bestens.

Zu den Versuchen wurden die folgenden zehn Pilze herangezogen: Botrytis Bassiana, Penicillium glaucum Link (aus der Kralschen Sammlung), Mucor γ Boidin, Cladosporium herbarum, Phytophthora infestans, Penicillium brevicaule, Aspergillus glaucus, Aspergillus niger, Isaria farinosa und Fusisporium.

1. Versuch. Die genannten Pilze wurden in eine Nährlösung (in Erlenmeyerkölbchen zu 50 ccm) von der Zusammensetzung: 1000 ccm Leitungswasser, 50 g Handelsraffinade, 1 g KNO_2, 0,5 g KH_2PO_4,

---

[1]) O. Hagem, Untersuchungen über norwegische Mucorineen II, Videnskabs-Selskabets Skrifter I. Math. nat. Kl, 1910, No. 4, Sonderabdruck.

[2]) Al. Kossowicz, Diese Zeitschrift, Bd. 1, 1912, S. 319.

[3]) G. E. Ritter, Ber. der deutschen botanischen Gesellschaft, Bd. 29, 1911, S. 590.

0,5 g $MgSO_4$ eingebracht. Schon nach 2 bis 3 Tagen zeigten die Pilze bei einer Versuchstemperatur von 20° C gute Entwicklung.

Nach Verlauf von 9 Tagen gab nur Mucor Boidin noch Nitritreaktion, jedoch keine Reaktion mit dem Nesslerschen Reagens. Eine schwache Reaktion mit dem Nesslerschen Reagens wurde bei Botrytis Bassiana, Penicillium glaucum, Cladosporium herbarum und Fusisporium vorgefunden; die übrigen Pilze zeigten eine kräftige Reaktion. Natürlich ist dies kein Beweis für die Ammoniakbildung, sondern nur für das Vorhandensein reduzierender Substanzen in der Nährlösung. Nitratbildung konnte nicht nachgewiesen werden.

2. Versuch. Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm Leitungswasser, 2 g KNO_2, 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, 20 g Handelsraffinade. Alle zehn Pilze kamen bei einer Versuchstemperatur von 20° C zu einer guten kräftigen Entwicklung und Fruktifikation.

3. Versuch. Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm Leitungswasser, 10 g Mannit, 5 g KNO_2, 10 g weinsaures Kalium-Natrium, 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$. Alle Pilze kamen zur Entwicklung und Fruktifikation. Der Nachweis von Ammoniak mit dem Nesslerschen Reagens fiel vor und nach Zusatz von Soda und Natronlauge negativ aus, es konnte keine Ammoniakbildung festgestellt werden. Es ist also die Annahme nicht unberechtigt, daß manche Pilze das Nitrit-Jon auch direkt, ohne vorherige Bildung von Ammoniak, zu assimilieren vermögen.

4. Versuch. Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 10 g KNO_2, 25 g Dextrose, 2,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, eine Spur $CaCO_3$ und $FeCl_3$. Die Pilze zeigten nach Verlauf von 2 bis 4 Tagen bei einer Versuchstemperatur von 20° C gute Entwicklung und Fruktifikation. Alle Erlenmeyerkölbchen mit den Pilzkulturen und auch die unbeimpften Kontrollkölbchen gaben eine sehr kräftige Reaktion mit dem Nesslerschen Reagens; diese Reaktion ist auf die Dextrose zurückzuführen, nicht etwa auf eine Ammoniakaufnahme aus der Luft, denn zwei Kontrollkölbchen mit der gleichen Nährlösung, der nur die Dextrose fehlte, gaben die Reaktion nicht. Das Nesslersche Reagens verändert sich übrigens, nebenbei bemerkt, frei der Luft ausgesetzt, auch erst nach längerer Zeit.

5. Versuch. Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 5 g KNO_2, 10 g Mannit, 0,2 g KH_2PO_4, 0,2 g $MgSO_4$, eine Spur $CaCO_3$ und $FeCl_3$. Alle Pilze, mit Ausnahme des schwach entwickelten A. niger, zeigten nach einer Woche gute Entwicklung

und Fruktifikation. Die Reaktion mit dem Nesslerschen Reagens fiel bei acht Pilzen vor und nach Zusatz von Soda und Natronlauge negativ aus, nur bei Phytophthora und Fusisporium konnte Ammoniakbildung festgestellt werden.

Erwähnt sei noch, daß sich im allgemeinen in meinen Versuchen Dextrose und Rohrzucker als Kohlenstoffquelle viel besser bewährt haben, als Mannit.

Hier wurde nur eine Auswahl der ausgeführten Versuche gegeben, aus denen jedoch schon deutlich hervorgeht, daß alle zehn daraufhin untersuchten Schimmelpilze Nitrite als alleinige Stickstoffquelle assimilieren können. Da hierbei ein Ammoniaknachweis nur bei zwei Pilzen erbracht werden konnte, ist also die Schlußfolgerung berechtigt, daß Schimmelpilze das Nitrit-Jon auch direkt, ohne vorhergehende Reduktion zu Ammoniak, aufnehmen können. In sonst guten Nährlösungen wurde bei mäßigen Konzentrationen eine besondere Giftwirkung von Nitriten auf Schimmelpilze nicht beobachtet.

Von mir gemeinsam mit Herrn Militärunterintendanten Josef Hanisch ausgeführte Untersuchungen über die Nitratassimilation durch Schimmelpilze wird eine nächste Mitteilung bringen.

Rhodanverbindungen (Schwefelcyanverbindungen) als Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefelquelle für Schimmelpilze, Sproßpilze (Hefen) und Bakterien.

Von **Alexander Kossowicz** und **Leopold von Gröller.**

I. Mitteilung.

Verhalten der Schimmelpilze zu Rhodanverbindungen. I.

Wegen des Vorkommens von Rhodanverbindungen im Harn und im unreinen Ammonsulfat, sowie der Verwendung rhodanhaltiger Präparate, wie der „Sulfocyanure" als Düngemittel, kommen Untersuchungen über die Umsetzungen, die Schwefelcyanverbindungen durch Mikroorganismen erleiden, eine gewisse Bedeutung für die landwirtschaftliche Praxis zu, umsomehr als die Düngungsversuche mit rhodanhaltigen Materialien selbst recht widersprechende Resultate ergaben[1]. Auch in Nahrungsmitteln sind Rhodanverbindungen enthalten, so in der Milch[2], im Käse[3] und auch der menschliche Speichel weist geringe Mengen von Rhodanaten[4] auf.

Die Literatur über das Verhalten von Mikroorganismen zu Schwefelcyanverbindungen ist eine recht spärliche. Nach Nägeli[5] wird Rhodanammon von Pilzen nicht assimiliert. Holchewnikoff[6] konnte eine Zersetzung von Rhodanverbindungen durch Bakterien nicht beobachten.

---

[1] Die weitere Literatur hierüber findet der Leser in F. Löhnis, Handbuch der landwirtschaftlichen Bakteriologie, 1910, S. 600, 601.

[2] P. Sommerfeld, Handbuch der Milchkunde, 1909, S. 103.

[3] F. J. Herz, Österr. Molkereizeitung, Bd. 2, 1895, S. 162.

[4] W. Kruse, Allgemeine Mikrobiologie, 1910, S. 652.

[5] Nägeli, Unters. über niedere Pilze. München und Leipzig, 1882, S. 67.

[6] Holchewnikoff, Fortschritte der Medizin, Bd. 7, 1889, S. 201.

Man findet in seiner Abhandlung darüber nur die kurze Notiz: „Alle Versuche mit Rhodanverbindungen fielen negativ aus." Weitere Angaben über seine Versuche fehlen. Eine Entwicklung von Aspergillus niger in einer Rhodannatriumlösung (weiße Decke) beobachtete Czapek[1]), ein Befund der kürzlich von Puriewitsch[2]) bestätigt wurde, der über die Assimilation von Kaliumrhodanat durch diesen Pilz berichtet. Nach Beijerinck[3]) werden Rhodanate durch Bakterien unter Schwefelabscheidung zersetzt; weitere Angaben hierüber fehlen auch hier. Anzuschließen wären noch die Beobachtungen von Munro[4]) und Perotti[5]), die in mit Erde geimpften Nährlösungen eine Überführung von Rhodanverbindungen in Ammoniak feststellen konnten.

Unsere Untersuchungen wurden nun ausgeführt, um zu erfahren, ob Rhodanverbindungen Schimmelpilzen, Sproßpilzen (Hefen) und Bakterien 1. als Stickstoffquelle, 2. als Kohlenstoffquelle, 3. als gemeinsame Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, 4. als Schwefelquelle dienen können und 5. ob und inwieweit sie eine Giftwirkung auf Mikroorganismen ausüben.

Zu den Versuchen wurden zunächst die nachfolgenden Schimmelpilze in Reinzucht verwendet: Botrytis Bassiana, Penicillium glaucum, Mucor γ Boidin, Cladosporium herbarum, Phytophthora infestans, Penicillium brevicaule, Aspergillus glaucus, Aspergillus niger, Isaria farinosa und Fusisporium.

I. Rhodanate als Stickstoffquelle.

1. Versuch: Rhodanammon als Stickstoffquelle. Eine sterilisierte Nährlösung von der Zusammensetzung 1000 ccm Leitungswasser, 3 g NH_4CNS, 25 g Dextrose, 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$ in Erlenmeyerkölbchen zu 50 ccm wurde mit den oben genannten Pilzen beimpft und bei einer Temperatur von ca. 20° C gehalten. Schon nach 2 bis 3 Tagen zeigten alle zehn Pilze Entwicklung. Die weitere Entwicklung schritt dann nur langsam weiter fort und kam nach ca. 8 Tagen zum Stillstande. Die direkte Prüfung auf Schwefelwasserstoffbildung mit Blei-

---

1) F. Czapek, Beiträge zur chem. Physiologie und Pathologie, Bd. 3, 1903, S. 47.

2) K. Puriewitsch, Biochemische Zeitschrift, Bd. 38, 1912, S. 13.

3) M. W. Beijerinck, Centralbl. f. Bakt. 2. Abt. Bd. 11, 1904, S. 593.

4) J. H. M. Munro, Chemic. News, 53, 1886, S. 307; Journ. Chem. Soc. 49, 1886, S. 632.

5) R. Perotti, Staz. sperim. agrar. ital., 39, 1906, S. 406.

papier und Bleizuckerlösung ergab ein negatives Resultat. 14 Tage nach Versuchsbeginn eingehängte Bleipapierstreifen wurden nach Verlauf von 10 Tagen nur von Mucor Boidin, A. glaucus und A. niger geschwärzt. Von den zehn untersuchten Pilzen waren also nur diese drei Pilze befähigt, in der sulfathaltigen Nährlösung Schwefelwasserstoff zu entwickeln. Der Versuch dauerte vier Wochen. Nach Verlauf dieser Zeit hatten alle Pilze in der Nährlösung schwächliche Decken mit Fruktifikation aufzuweisen. Die Nährlösungen blieben klar. Eine Schwefelabscheidung trat nicht ein.

2. Versuch: Kaliumrhodanat als Stickstoffquelle. Die Nährlösung bestand aus 1000 ccm Leitungswasser 5 g KCNS, 25 g Dextrose, 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$. Temperatur 20° C, Versuchsdauer 30 Tage. Die Entwicklung der Pilze war eine schwache und kam schon nach wenigen Tagen zum Stillstande. Nur Cladosporium herbarum und Fusisporium zeigten eine ansehnliche Entwicklung. Ersterer war dunkelolivgrün, Fusisporium rot gefärbt. Die Reaktion der Nährlösung war am Schlusse des Versuchs schwach sauer. Schwefelwasserstoffbildung hatte nur bei Mucoir Boidin stattgefunden. Die Nährlösungen blieben klar. Eine Schwefelabscheidung konnte nicht wahrgenommen werden.

3. Versuch: Natriumrhodanat als Stickstoffquelle. Die Versuchsanordnung entsprach der des 2. Versuches. Die Pilze zeigten das gleiche Verhalten wie im 2. Versuch.

4. Versuch: Kaliumrhodanat als Stickstoffquelle. Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 1000 ccm dest. Wasser, 2 g KCNS, 5 g Mannit, 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$. Temperatur 20° C, Versuchsdauer vier Wochen. Alle Pilze zeigten schwache aber deutliche Entwicklung, die beste Entwicklung war bei Isaria farinosa und Fusisporium zu bemerken. Die Entwicklung kam nach einer Woche zum Stillstand. Ammoniak, Nitrit und Nitrat konnten in der Nährlösung nicht nachgewiesen werden.

5. Versuch: Ferrum rhodanatum als Stickstoffquelle. Wie der 4. Versuch, nur enthielt die Nährlösung statt KCNS 2 g Eisenrhodanat. Versuchsdauer vier Wochen. Alle Pilze zeigten sehr schwache Entwicklung.

In den sterilisierten unbeimpften Kontrollkolben konnten weder Schwefelabscheidung noch Ammoniak-, Nitrit- oder Nitrat-Bildung wahrgenommen werden. Pilzkulturen in Nährlösungen der gleichen Zusammensetzung ohne jede Stickstoffquelle zeigten nur manchmal sehr geringfügige Flockenbildung während der Versuchsdauer von vier Wochen.

Aus diesen fünf Versuchen folgt, daß alle untersuchten Pilze Rhodanverbindungen, am besten NH_4CNS, als Stickstoffquelle verwerten können.

II. Rhodanverbindungen als Kohlenstoffquelle.

Zur Verwendung kamen die nachfolgenden Nährlösungen bei einer Versuchstemperatur von 20° C und einer Versuchsdauer von vier Wochen.

1. Versuch: Ammoniumrhodanat als Kohlenstoffquelle. 1000 ccm Leitungswasser, 5 g NH_4CNS, 2 g KNO_3, 2 g NH_4NO_3, 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$.

2. Versuch: Rhodankalium als Kohlenstoffquelle. 1000 ccm Leitungswasser, 5 g KCNS, 2 g KNO_3, 2 g NH_4NO_3, 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$.

3. Versuch: Natriumrhodanat als Kohlenstoffquelle. 1000 ccm Leitungswasser, 5 g NaCNS, 2 g KNO_3, 2 g NH_4NO_3, 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$.

4. Versuch: Ferrum rhodanatum als Kohlenstoffquelle. Wie Versuch 3, nur enthielt die Nährlösung statt Natriumrhodanat 2 g Eisenrhodanat.

5. Versuch: Natriumrhodanat als Kohlenstoffquelle. 1000 ccm destilliertes Wasser, 2 g NaCNS, 2 g $(NH_4)_2HPO_4$, 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, eine Spur $FeCl_3$.

In allen diesen fünf Versuchen kam es, abgesehen von geringen Flockenbildungen, zu keiner Entwicklung. Die zehn untersuchten Pilze können Rhodanverbindungen als alleinige Kohlenstoffquelle nicht ausnützen.

III. Rhodanverbindungen als gemeinsame Kohlenstoff- und Stickstoffquelle.

Es kamen die nachfolgenden Nährlösungen in Verwendung bei einer Versuchstemperatur von 20° C und einer Versuchsdauer von vier Wochen.

1. Versuch: Ammoniumrhodanat als gemeinsame Kohlenstoff- und Stickstoffquelle. 1000 ccm Leitungswasser, 2 g NH_4CNS, 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$.

2. Versuch: Desgleichen, mit höherer Konzentration ohne weitere Schwefelverbindungen. 1000 ccm Leitungswasser, 10 g NH_4CNS, 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgCl_2$.

3. Versuch: Kaliumrhodanat als gemeinsame Kohlenstoff- und Stickstoffquelle. 1000 ccm Leitungswasser, 2 g KCNS, 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$.

4. Versuch: Desgleichen, mit höherer Konzentration, ohne weitere Schwefelverbindungen. 1000 ccm Leitungswasser, 10 g KCNS, 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgCl_2$.

5. Versuch: Natriumrhodanat als gemeinsame Kohlenstoff- und Stickstoffquelle. 1000 ccm Leitungswasser, 10 g NaCNS, 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgCl_2$.

6. Versuch: Ferrum rhodanatum als gemeinsame Kohlenstoff- und Stickstoffquelle. 1000 ccm Leitungswasser, 5 g Rhodaneisen, 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgCl_2$.

In diesen sechs Versuchsreihen zeigten die zehn Pilze, abgesehen von gelegentlichen sehr geringfügigen Flockenbildungen keine Entwicklung, sie waren also nicht imstande Rhodanverbindungen als alleinige gemeinsame Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu benutzen.

IV. Rhodanverbindungen als Schwefelquelle.

Eine vollständige Ausschließung von geringen Schwefelspuren in den Nährlösungen ist bekanntlich kaum zu erreichen[1]). Doch lassen sich schon aus dem Vergleich der Pilzentwicklung in Nährlösungen, die Rhodanverbindungen enthalten und in solchen, die überhaupt keinen Zusatz von Schwefelverbindungen bekamen, ganz gute Schlüsse ziehen.

1. Versuch: Nährlösung ohne Schwefelverbindungen. 1000 ccm destilliertes Wasser, 10 g Mannit, 1 g KH_2PO_4, 2 g KNO_2, 2 g NH_4Cl, 0,5 g $MgCl_2$, eine Spur $CaCO_3$ und $FeCl_3$. Versuchstemperatur 20° C, Versuchsdauer vier Wochen. Die Pilze zeigten darin nur geringfügige Flockenbildungen.

2. Versuch: Kaliumrhodanat als alleinige Schwefelquelle. 1000 ccm destilliertes Wasser, 5 g KCNS, 10 g Mannit, 1 g KH_2PO_4, 2 g KNO_2, 2 g NH_4Cl, 0,5 g $MgCl_2$, eine Spur $CaCO_3$ und $FeCl_3$. Versuchstemperatur 20° C, Versuchsdauer vier Wochen. Alle Pilze zeigten Entwicklung und schwache Deckenbildung. Eine Schwefelabscheidung konnte nicht wahrgenommen werden, ebensowenig Schwefelwasserstoff- und Schwefelsäurebildung.

3. Versuch: Ammoniumrhodanat als gemeinsame Stickstoff- und Schwefelquelle. 1000 ccm destilliertes Wasser, 5 g NH_4CNS, 20 g Dextrose, 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgCl_2$, eine Spur $CaCO_3$ und $FeCl_3$. Versuchstemperatur 20° C, Versuchsdauer vier Wochen. Alle zehn Pilze zeigten Entwicklung und schwache Deckenbildung. Sie vermochten jedenfalls den Schwefel der Rhodanverbindungen aus-

[1]) W. Benecke, Jahrb. f. wissenschaftl. Bot., 1895, Bd. 28, S. 487.

zunutzen. Schwefelsäure war in der Nährlösung nicht nachweisbar. Eine Schwefelabscheidung trat nicht ein. Mucor Boidin zeigte starke Schwefelwasserstoffentwicklung.

V. Giftwirkung der Rhodanverbindungen.

Es wurde bereits eingangs erwähnt, daß die Entwicklung der Pilze in Rhodannährlösungen meist schon nach wenigen Tagen eine Hemmung erfuhr und bald zum Stillstand kam. Es erschien daher von Interesse, die Giftwirkung der Rhodanverbindungen auf Pilze zu prüfen.

1. Versuch: 1 % Rhodankalium. 1000 ccm Leitungswasser, 10 g $KCNS$, 5 g KNO_3, 5 g NH_4NO_3, 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, 25 g Dextrose. Versuchstemperatur 20° C, Versuchsdauer vier Wochen. Schon nach 3 bis 4 Tagen zeigten die Pilze deutliche Entwicklung und Deckenbildung, die aber nach ca. 8 bis 10 Tagen zum Stillstand kam. Nach vier Wochen wurden die Pilze aus den Rhodannährlösungen auf Kartoffelstreifen und auf Würzeagar abgeimpft, wo sie zur Entwicklung kamen. Die Pilze hatten also in der 1-prozentigen Rhodankalilösung keine Abtötung erfahren. Von den zehn Pilzen zeigte nur Mucor Boidin Schwefelwasserstoffbildung in der Rhodanatlösung.

2. Versuch: 3 % Kaliumrhodanat. Die Nährlösung und Versuchsanordnung war sonst die gleiche wie im 1. Versuch. Das Verhalten der Pilze war ebenfalls gleich.

3. Versuch: 10 % Kaliumrhodanat. Die Nährlösung und Versuchsanordnung war sonst die gleiche wie im 1. Versuch. Es kam in der Nährlösung zu ziemlich guter Entwicklung der Pilze; sie erfuhren im Laufe von vier Wochen keine Abtötung.

4. Versuch: 0,2 % Kaliumrhodanat. Die Nährlösung und Versuchsanordnung war sonst die gleiche wie im 1. Versuch. Die Pilze zeigten gute Entwicklung und Fruktifikation.

5. Versuch: 0,2 % Natriumrhodanat. Sonst wie der 4. Versuch. Die Pilze zeigten gute Entwicklung und Fruktifikation.

6. Versuch: 0,5 % Kaliumrhodanat. Sonst wie der 4. Versuch. Die Entwicklung der Pilze war eine langsamere und schwächere wie im 4. Versuch. Die Pilze zeigten Fruktifikation.

7. Versuch: 1 % Rhodankalium. 1000 ccm destilliertes Wasser, 10 g $KCNS$, 2 g $(NH_4)_2HPO_4$, 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, 25 g Dextrose, eine Spur $FeCl_3$. Die Entwicklung der Pilze war eine wesentlich bessere als im 1. Versuch, die Entwicklungshemmung weit weniger merklich.

Zusammenfassung.

Aus den hier mitgeteilten Versuchen geht hervor:

1. Die zehn daraufhin geprüften Pilze können Rhodanverbindungen als Stickstoffquelle verwerten.

2. Hierbei erfolgt eine Schwefelwasserstoffentwicklung durch Mucor Boidin und nur ausnahmsweise durch A. niger und A. glaucus.

3. Die zehn daraufhin geprüften Pilze vermögen Rhodanverbindungen als Schwefelquelle auszunützen. Schwefel wird dabei nicht abgeschieden; Mucor Boidin entwickelt Schwefelwasserstoff.

4. Die zehn daraufhin geprüften Pilze sind nicht imstande Rhodanverbindungen als alleinige Kohlenstoffquelle und als alleinige gemeinsame Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu verwerten.

5. Rhodanverbindungen üben eine deutliche Entwicklungshemmung auf Pilze aus. In sonst guten Nährlösungen zeigen die Schimmelpilze schon bei einem Gehalt von 0,5 % KCNS eine schwächere Entwicklung und Fruktifikation. Eine Abtötung der Pilze tritt aber auch in 1 % bis 10 % Rhodanatnährlösungen innerhalb einer Versuchsdauer von vier Wochen nicht ein. Auch bei 10 % Kaliumrhodanat hört die Entwicklung der Pilze nicht auf.

6. In mannithaltigen Nährlösungen ist die Entwicklung der Pilze eine viel schwächere und langsamere als in dextrosehaltigen Nährlösungen.

Versuche zur analytischen Bestimmung freier Schwefelsäure neben organischen Säuren und deren gärungsphysiologische Wirkung mit besonderer Berücksichtigung von Brennereimaischen.

Von **E. Bauer.**

Die Frage des Nachweises und der Bestimmung freier Schwefelsäure neben organischer Säure und deren Wirkung auf gärende Hefezellen ist nicht nur wissenschaftlich, sondern auch praktisch von weiterem Interesse.

Der Ersatz der Milchsäure bezw. des Milchsäureprozesses bei Herstellung von Hefenmaische durch Verwendung von Schwefelsäure hat im Brennereibetriebe Bedeutung erlangt. Die säurebildende und proteolytisch wirkende Funktion der Milchsäurebakterien konnte durch direkte rationelle Ernährung der Hefenpilze unter Anwendung geringer Schwefelsäuremengen vollkommen entbehrlich gemacht werden.

Die vom Verfasser gegebenen Schwefelsäuretabellen für verschiedene Maischmaterialien und Konzentrationen, welche mit Rücksicht auf den verschiedenen Aschen- und Aziditätsgrad derselben begrenzt wurden, haben sich im allgemeinen vollkommen bewährt. Immerhin mußten folgende Fragen von Interesse bleiben:

1. Kann das Auftreten freier Schwefelsäure durch eine praktikable und bekannte Methode erkannt werden?

2. Ist freie Schwefelsäure für die Hefe und Gärung unter normalen Verhältnissen schädlich?

3. Können die in Betracht kommenden Mengen den Mastwert der Schlempe schädigen oder für die Brennapparate gefährlich sein?

Vorausgesetzt sei, daß die Schwefelsäuremengen, welche nach dem Bauerschen Verfahren für Kartoffel-, andererseits für Maismaischen zur Anwendung gelangen, infolge des divergierenden Aschengehaltes der beiden Materialien verschieden sein mußten.

Der Aschengehalt des Maises kann im Durchschnitt auf 1,5—1,8 % gesetzt werden, während derselbe bei Kartoffeln nur etwa 1 % beträgt. Allein in Rücksicht dessen, daß 100 kg Mais 350—400 Liter Maische ergeben, wogegen Kartoffeln rund 100—120 Liter, bleibt für den Aschengehalt der Maismaische nur 0,4—0,6 % übrig, für die Kartoffelmaische dagegen 0,8—0,9 %. Es war also vorauszusetzen, daß die Maismaische in diesem Verhältnisse weniger Schwefelsäure in Anspruch nehmen wird, um die an organische Säuren gebundenen Basen zu binden, wogegen andererseits entsprechend weniger organische Säuren erwartet werden konnten. In der Tat ergaben außerdem einige Veraschungsversuche, daß die Kartoffelasche eine relativ höhere Alkalinität aufweist, als jene der Maismaische.

Auf 100 g Substanz berechnet erforderte die Asche

von Kartoffeln	10,7	ccm	N. Schwefelsäure
von südungarischem Mais (Pferdezahn) .	5,87	„	„
von kleinkörnigem Jungmais (Cinquantin) .	3,76	„	„

Derartige Zahlen können allerdings nur einen beispielsweisen Wert beanspruchen, da dieselben großen Schwankungen unterworfen sein müssen.

Immerhin rechtfertigen diese Zahlen die Annahme, daß in der Regel die Kartoffel an und für sich höhere Säuremengen vertragen würde, als der Mais.

Die nach Bauer für die Brennereipraxis vorgeschriebene Schwefelsäuremenge auf 100prozentige Säure gerechnet beträgt für Kartoffelmaische von 14—24° S: — 220—260 g.

Für Maismaischen von 14—20° S: — 121—135 g. Die dadurch bewirkte Azidität schwankt bei Kartoffelmaischen zwischen 6,0—7,5 ccm N. Lauge auf 100 ccm bezogen, bei Maismaische zwischen 4,0—4,5 ccm.

Um nun der Frage näher zu kommen, ob innerhalb dieser Aziditätsgrenzen in der Maische freie Schwefelsäure, und in jener Menge auftreten könne, welche für Gärung, Apparatur und Mastung Bedenken erregen könnte, wurde eine Reihe von Versuchen angestellt.

Vorerst wurden einige zu diesem Zwecke empfohlene Indikatoren und die Titrationsmethode im allgemeinen auf Anwendungsmöglichkeit geprüft, doch gaben, wie voraussichtlich war, sämtliche zugezogene Indikatoren ein negatives Resultat.

Geprüft wurden die als Pflanzensäuren in Betracht kommenden Weinsäure, Oxalsäure und Zitronensäure.

Entsprechend 1/20 Normalgewicht wurden 0,75 g Weinsäure, 0,45 g kristallwasserfreie Oxalsäure, 0,70 g Zitronensäure in je 200 ccm destilliertem Wasser gelöst. Je 50 ccm dieser Lösungen, entsprechend 2,5 ccm $\frac{n}{1}$ organischer Säure wurden mit 0,5 ccm $\frac{n}{1}$ H_2SO_4 versetzt, so daß die Gesamtazidität 3 ccm entsprach und 1. mit $\frac{n}{1}$ Lauge titriert; 2. diese $\frac{n}{1}$ Lauge mit $\frac{n}{1}$ Schwefelsäure zurücktitriert.

Es sollten somit die ersten 0,5 ccm zugesetzter Lauge die Schwefelsäure binden, die weiteren 2,5 ccm die organische Säure, während umgekehrt beim Rücktitrieren mit $\frac{n}{1}$ H_2SO_4 bei 2,5 ccm die an Natron gebundene organische Säure in Freiheit gesetzt, worauf nach dem ersten Tropfen weiteren Zusatz freie H_2SO_4 durch den Indikator angezeigt werden sollte.

Die beobachteten Farbenübergänge bezw. Umschlagsgrenzen sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Diese Tabelle genügt, die vollkommene Unbrauchbarkeit der Titrationsmethoden zur quantitativen Unterscheidung von anorganischen neben organischen Säuren darzutun. Selbstredend werden die Verhältnisse bei komplizierten Gemischen und gefärbten Lösungen, wie dies auch bei Maische der Fall ist, noch weit ungünstiger hervortreten.

Auch die Fällungsmethoden werden in kolloiden Lösungen und in Anbetracht der präexistierenden Sulfate vollständig versagen, ebenso wie etwa indirekte Schlüsse aus der Zusammensetzung oder Reaktion einer Asche niemals auf einen vormaligen Überschuß an freier Schwefelsäure zulässig sein können, geschweige denn auf die quantitative Menge.

Aus dem Gesetze des chemischen Gleichgewichts (Goldberg und Waage) mußte vorausgesetzt werden, daß die in verdünnten Lösungen vor sich gehende Wechselwirkung zwischen organischen Salzen und freier Schwefelsäure keine stöchiometrisch glatte Reaktion stattfinden lasse. Abhängig von der Konzentration, den Mengenverhältnissen, von physikalischen Momenten und den Affinitätswerten der vorhandenen anorganischen und Pflanzensäuren, wird das zu erwartende Verhältnis kaum ein konstantes sein, doch müßte zweifellos ein Teil der Schwefelsäure als Endglied im Ionenzustande auftreten.

Als die in Knolle und Frucht vorkommenden Säuren wären in erster Linie in Betracht zu ziehen: Oxalsäure, Apfelsäure, Weinsäure, Zitronensäure, Pektinsäure und ähnlich wirkende schwache Säuren, endlich Milchsäure.

Da die Affinitätsdifferenzen dieser verschiedenen Säuren gegenüber der Schwefelsäure kaum wesentlich zur Geltung kommen werden, würde vorerst die Erforschung der Zersetzungsvarianten an einem einfachen

Tabelle 1.

	Weinsäure		Oxalsäure		Zitronensäure	
	I Titriert mit $\frac{n}{1}$ Lauge	II Rücktitriert mit $\frac{n}{1}$ Säure	I Titriert mit $\frac{n}{1}$ Lauge	II Rücktitriert mit $\frac{n}{1}$ Säure	I Titriert mit $\frac{n}{1}$ Lauge	II Rücktitriert mit $\frac{n}{1}$ Säure
Methylviolett. Bei sämtlichen Titrationen die Farbenübergänge allmählich. Grenze zwischen organischer und anorganischer Säure nicht erkennbar.	Farbe bei 0,7 ccm zweifelhaft violett, erst bei 1,0 ccm zweifellos violett (statt bei 0,5 ccm); von ca. 1,4 ccm bis 3,0 ccm unverändert rotviolett	Farbe bei 2,25 ccm blauviolett, 2,5 ccm blauviolett, 2,75 ccm blauviolett, erst bei 3,15 ccm stahlblau (statt bei 2,5 ccm)	Farbe bei 1,5 ccm deutlich violett (statt bei 0,5 ccm); bei 2,0 ccm bis 3,0 ccm violett	Farbe bei 1,5 ccm blauviolett bei 2,0 ccm hellblau bei 2,3 ccm stahlblau (statt bei 2,5 ccm)	Farbe bei 0,7 ccm violett (statt bei 0,5 ccm) bei 1,3 ccm bis 3,0 ccm rotviolett	Farbe bis 2,8 ccm allmählich blau (statt bei 2,5 ccm scharf blau)
Äthylorange	Übergänge ganz allmählich von Orange in Gelb, vice versa von Gelb in Orange, nach Bindung der anorganischen Säure ist eine Farbenänderung nicht zu beobachten.					
Congorot	Allmähliche Übergänge von Braunrot in Violett und umgekehrt. Unterschied beim Prävalieren der anorganischen Säure ist nicht zu bemerken.					
Cochenille	Allmählicher Übergang von Rot in Orange und in entgegengesetzter Reihenfolge beim Rücktitrieren. Unterschied beim Übergang von organischer in anorganische Säure nicht vorhanden.					
Rosolsäure	Übergang von Rot in Gelb und umgekehrt, ebenfalls ganz allmählich.					
Salicylsaures Eisen	Indikator bleibt farblos; die erste Spur Alkali färbt die Lösung orange.					

organischen Salze, wie etwa solche dem praktischen Vorgange in der Maische entsprechen würden, von hohem Interesse sein. Es wurde versucht dieser Frage auf direktem Wege einigermaßen näher zu kommen durch Anwendung einer Methode, die, wie von vornherein betont, keineswegs als einwandfrei betrachtet werden kann, jedoch die einzige Möglichkeit bot, die Menge der freien Schwefelsäure auf direktem Wege zu bestimmen. Zu diesem Zwecke wurde chemisch reiner Weinstein ($C_4H_4O_6KH$) in destilliertem Wasser gelöst und mit steigenden Mengen Halbnormalschwefelsäure versetzt. Die dann am Wasserbade bis fast zur Trockne eingedunstete Lösung wurde zum Lösen der Schwefelsäure mit 96,5prozentigem Alkohol digeriert und abfiltriert. Die mit Wasser versetzte alkoholische Lösung wurde zur Bestimmung der Schwefelsäure mit Chlorbarium benutzt.

Ein Kontrollversuch ergab, daß der alkoholische Auszug nur 0,0005 g in Lösung gegangenes Salz enthielt, somit eine zu vernachlässigende Spur.

Diese Methode würde also keineswegs das wirkliche Zustandsverhältnis in der ursprünglichen Lösung erkennen lassen, da mit zunehmender Konzentration und verminderter Löslichkeit des Salzgemisches veränderte Verhältnisse eintreten müssen. Immerhin wird der positive Nachweis der Schwefelsäure in Verbindung mit der weiter befolgten physiologischen Methode als Beweis zu gelten haben, daß tatsächlich eine, je nach den Verhältnissen variable Menge von freier Schwefelsäure auftreten wird und daß in verdünnten Lösungen eine Vergrößerung der Dissoziationsverhältnisse vorauszusetzen wäre.

Stöchiometrisch würde 1 g Weinstein ($C_4H_4O_6KH$) zur Bildung von K_2SO_4 eine Menge von 260,65 mg Schwefelsäure erfordern, oder 10,62 ccm $\frac{n}{2}$ Schwefelsäure. Es ist anzunehmen, daß bei ungenügendem Schwefelsäurezusatz die Bildung von K_2SO_4 begünstigt wird, dagegen mit größerem Säurezusatz die Bildung von $KHSO_4$, so daß, je nach dem möglichen Gleichgewichtszustande die Bildungsphasen durch folgendes Schema zum Ausdruck gelangen würden:

$$C_4H_4O_6KH + \gtrless H_2SO_4$$
$$= \gtrless (H_2SO_4 + KHSO_4 + K_2SO_4 + C_4H_4O_6KH + C_4H_6O_6).$$

Aus dieser Überlegung ergibt sich, daß die absolute Bindungsmenge der Schwefelsäure steigen muß mit zunehmender Gabe, bezw. mit der Bildung des sauren Salzes. Diese Voraussetzung wird durch die tatsächlich erhaltenen Resultate der ersten Versuchsreihe bestätigt.

I. Versuchsreihe.

Angewendet je 1 g saures weinsaures Kalium. Berechnete erforderliche Säuremenge für K_2SO_4—260,65 mg, für $KHSO_4$—521,3 mg.

Tabelle 2.

Zusatz von ccm $^n/_2$ H_2SO_4	H_2SO_4 mg	Verbliebene freie Schwefelsäure mg	Gebundene Schwefelsäure mg	Gebundene Schwefelsäure %
2,5 ccm . . . . =	61,3	15,5	45,8	74,71
5,0 „ . . . . =	122,5	23,9	98,6	80,49
9,0 „ . . . . =	220,5	30,2	190,3	86,30
10,5 „ . . . . =	257,2	35,5	221,8	86,24
11,5 „ . . . . =	281,8	35,1	246,7	87,54
20,0 „ . . . . =	490,0	84,6	405,4	82,65
25,0 „ . . . . =	612,5	118,7	493,8	80,62

Wenngleich diese knappe Versuchsreihe nicht genügt, um aus den bestimmten Punkten die gesetzmäßigen Funktionen zu berechnen, so geht doch für die praktische Frage klar daraus hervor:

1. daß selbst bei ganz ungenügendem Säurezusatze (erstes Glied) rund mindestens der vierte Teil der zugesetzten Säure im freien Zustande verblieb,

2. die Menge der gebundenen Säure selbst bei beträchtlichem Überschuß nicht die theoretische Bindungszahl erreicht (letztes Glied),

3. die relative Bindungsmenge der Säure aufsteigend ist bis zur Überschreitung der berechneten Grenze für das neutrale Salz (5. Glied),

4. um dann bei der für das saure Salz sich nähernden Menge prozentual zurückzugehen (6. Glied).

Ferner läßt sich schon auf Grund dieser einfachen Versuchsverhältnisse erkennen, daß die relativen Bindungszahlen, die das Verhältnis der angewendeten zur gebundenen Säure angeben, außerhalb der Proportionalität stehen. Die Zustandsverhältnisse werden mit der Anzahl der Zwischenglieder, selbstredend somit mit der Anzahl der Anfangsglieder an Kompliziertheit zunehmen, ein gleiches Endstadium nur unter genau gleichen Bedingungen erwarten lassen.

Bei der unbekannten und so differenten Zusammensetzung der Maischen können somit nur empirisch festgestellte Durchschnittszahlen zur Anwendung gelangen. Bei nicht zu weiter Überschreitung der Grenzzahlen ist eine Gefahr für die Gärung nicht zu befürchten, da, wie ersichtlich, durch Bildung von sauren Salzen ein größerer Teil der Schwefelsäure unschädlich gemacht wird.

Um jedoch den Einfluß aufsteigender Schwefelsäuremengen auf die Intensität der Gärung bei Gegenwart von Nährstoffüberschuß und bei Gegenwart organischer Salze zu prüfen, wurden die unten folgenden Versuche angestellt. Der direkte Einfluß auf Gärung und Hefe war bereits wiederholt Gegenstand der Prüfung, so von Hayduck, Bokorny und Henneberg. Es wurden von diesen Forschern die Grenzwerte festgestellt für Schädigung der Hefezelle und der Gärung. Die für die praktische Anwendung im Brennereigewerbe statthabenden Momente blieben jedoch unberücksichtigt, so daß eine neuerliche vergleichende Prüfung der Frage von diesem Gesichtspunkte aus wünschenswert erschien.

II. Versuchsreihe.

Vorerst sollte festgestellt werden, bei welcher Aziditätsgrenze in reiner Rohrzuckerlösung mit überschüssigem Nährstoffzusatz eine Schädigung der Gärung eintritt. Zu diesem Zweck wurden je 70 g Rohrzucker und 5 ccm flüssiger Hefeextrakt auf 500 ccm aufgefüllt, sterilisiert und mit gleicher Menge aufgeschwemmter Reinhefe versetzt. Die Gärungsintensität wurde aus dem Gewichtsverluste bestimmt.

Nr. 1 ohne Schwefelsäurezusatz

Nr. 2 mit 2,5 ccm $\frac{n}{1}$ H_2SO_4 (Azidität 0,5 ccm 100 ccm = 24,5 mg)

Nr. 3 „ 5,0 „ „ „ „ 1,0 „ 100 „ = 49,0 „

Nr. 4 „ 7,5 „ „ „ „ 1,5 „ 100 „ = 73,5 „

Nr. 5 „ 10,0 „ „ „ „ 2,0 „ 100 „ = 89,0 „

Tabelle 3.

Gewichtsverlust während des Versuches in g CO_2. (Nach Pasteur 34,335 g.)

Tag	Temperatur °C	Nr. 1 Schwach sauer ohne H_2SO_4	Nr. 2 0,5 ccm Azidität	Nr. 3 1,0 ccm Azidität	Nr. 4 1,5 ccm Azidität	Nr. 5 2,0 ccm Azidität
1	21,5	13,15	7,10	4,12	1,88	0,25
2	20,0	8,82	4,85	3,55	1,70	1,80
3	18,0	5,10	3,45	2,08	1,00	0,62
4	17,2	3,20	2,50	1,55	0,82	0,68
5	16,5	1,97	2,10	1,52	0,68	0,60
6 7	18,0 18,0	2,38	2,95	1,68	0,50	0,51
	Summa	34,62	22,95	14,50	6,58	4,46

Es ergibt sich also, daß die volle Gärungsintensität nur bei Nr. 1, ohne Schwefelsäurezusatz, deren geringe Azidität nur von dem Hefeextrakt herrührt, erzielt wurde. Eine Azidität von 0,5 ccm = 0,024 g H_2SO_4 auf 100 ccm wirkte bereits schädigend.

Mit den von Hayduck gefundenen weit höheren Grenzzahlen stimmt dies nicht überein, doch ist ein direkter Vergleich nicht zulässig, da Hayduck mit unverhältnismäßig großen Mengen von Preßhefe, — 10 g auf 400 ccm —, arbeitete, während hier sehr geringe Mengen von Reinhefe verwendet wurden. Die Empfindlichkeit war somit eine größere[1]).

III. Versuchsreihe.

Der Zweck dieser Versuchsreihe war es zu ergründen wie weit die in I und II gefundenen Resultate in der Gärwirkung bei Gegenwart von organischem Salze, — in diesem Falle von Weinstein —, zur Geltung gelangen.

Je 70 g Rohrzucker mit 1,88 g Weinstein (entsprechend 10 ccm N. Säure im freien und 10 ccm im gebundenen Zustande) wurden unter Zugabe von 10 ccm flüssigem Hefeextrakt auf 500 ccm ergänzt. Die $^1/_{100}$ Molekulareinheit von 1,88 g Weinstein wurde deswegen gewählt, weil diesfalls die Azidität in 100 ccm genau 2 ccm betragen würde. Es verblieben dann 2 ccm gebundene Säure, welche durch 2 ccm N. Schwefelsäure in Freiheit gesetzt werden.

Es wurden vier Gärproben mit den verschiedenen Aziditätsverhältnissen gleichzeitig angestellt. Der Vorgang war derselbe wie bei II beschrieben, nur daß statt Reinhefe der Einfachheit halber je 5 g untergärige Bierhefe verwendet wurden. Außerdem wurde hier noch der gebildete Alkohol bestimmt.

Nr. 1 ohne Schwefelsäure (entsprechend 2 ccm $\frac{n}{1}$ freie organische Säure in 100 ccm).

Nr. 2 mit 5 ccm $\frac{n}{1}$ Schwefelsäure (entsprechend 3 ccm $\frac{n}{1}$ organische Säure + 1,0 ccm gebundene Schwefelsäure).

Nr. 3 mit 10 ccm $\frac{n}{1}$ Schwefelsäure (entsprechend 4 ccm $\frac{n}{1}$ organische Säure + 2,0 ccm gebundene Schwefelsäure).

---

[1]) Die Versuchsanstellungen Bokornys und Hennebergs bezogen sich nur auf die Abtötungs- und Schädigungsgrenzen bei kurzer Einwirkung von Schwefelsäure auf große Mengen von Hefe, verfolgten also eine ganz andere Fragestellung.

Nr. 4 mit 15 ccm $\frac{n}{1}$ Schwefelsäure (entsprechend 4 ccm $\frac{n}{1}$ organische Säure + 2,0 ccm gebundene Schwefelsäure + 1 ccm freie Schwefelsäure).

Tabelle 4.

Gewichtsabnahme in g CO_2. (Nach Pasteur 34,335 g.)

Azidität auf 100 ccm bezogen	Nr. 1 2 ccm organische Azidität	Nr. 2 3 ccm organische Azidität 1 ccm gebundene Schwefelsäure	Nr. 3 4 ccm organische Azidität 2 ccm gebundene Schwefelsäure	Nr. 4 4 ccm organische Azidität 2 ccm gebundene Schwefelsäure 1 ccm freie Schwefelsäure
1. Tag	15,5	9,72	9,68	4,41
2. Tag	15,05	18,48	14,88	6,99
3. Tag	3,65	5,90	6,80	4,80
4. Tag	0,68	0,92	2,60	1,80
Summa	34,83	35,02	33,88	18,00
Alkohol Vol. %	43,93	43,63	42,95	23,25
Ausbeute von 100 g Zucker	62,76	62,33	61,36	33,25

Aus diesen Versuchen geht somit hervor, daß Nr. 1 mit ausschließlich organischer Azidität am raschesten angegoren und die höchste Ausbeute ergeben hat. Allerdings war die Gärung in den weiteren Proben am vierten Tage nicht vollständig beendet.

Nr. 2 und Nr. 3 mit 3 und 4 ccm berechneter freier organischer Säure verloren am ersten Tage fast gleich viel Kohlensäure, am zweiten Tage bleibt Nr. 3 zurück, holt jedoch am vierten Tage Nr. 2 fast ein.

Nr. 4 mit 4 ccm freier organischer Säure und 1 ccm berechneter freier Schwefelsäure ergab ein ungleich schlechteres Gärresultat. Bereits aber durch Nr. 2 wird die Tatsache bestätigt, welche aus Versuch I und II erschlossen werden konnte, nämlich daß die Zustandsverhältnisse zwischen den in Reaktion tretenden Körpern labiler Art sind, so daß selbst bei einem Schwefelsäurezusatze von 50 % unter dem „Neutralisationswerte“ die Ionenwirkung der freien Schwefelsäure physiologisch zur Geltung gelangt, ferner, daß bereits sehr geringe Mengen von freier Schwefelsäure gärungsstörend zu wirken imstande sind.

Aus den Ergebnissen der Versuchsreihe I, erste Zeile ist für den Versuch Nr. 2 der letzten Tabelle, welche jenem ganz nahekommende Aziditätsverhältnisse aufweist, die in 100 ccm enthaltene freie Schwefelsäure auf Grund der Proportionalität auf ungefähr 31 mg zu schätzen, während nach 2 der II. Versuchsreihe bereits 0,5 ccm, d. i. 24,5 mg Schwefelsäure energisch hemmend wirkten.

IV. Versuchsreihe.

Aus der I. Versuchsreihe mußte geschlossen werden, daß unter den gegebenen Bedingungen bei der bezweckten Bildung von K_2SO_4 aus Weinstein von der äquivalenten Menge Schwefelsäure unter Berücksichtigung des gemachten Vorbehaltes mindestens 14 % im freien, also im Ionenzustande verbleiben (Versuch I, 4. Reihe).

Versuch Nr. 3 der III. Versuchsreihe, welches diesem Stadium entspricht, bestätigt die unverkennbare physiologische Wirkung der freien Schwefelsäure, deren hemmende Wirkung an sich aus der II. Versuchsreihe klar hervorgeht.

Sofern die aus dem Experiment sich ergebende Schlußfolgerung zutreffend ist, müßte derselbe Gleichgewichtszustand zu erwarten sein, sobald statt Weinstein und Schwefelsäure die äquivalenten Mengen freie Weinsäure und schwefelsaures Kali (K_2SO_4) in Lösung gebracht würden. Die Empfindlichkeit der Hefenzelle hätte hierfür den besten Maßstab zu bilden.

Es wurden zwei vergleichende Proben gleichzeitig angestellt.

Nr. 1. 70 g Rohrzucker + 10 ccm Hefeextraktfiltrat + 1,88 g Weinstein + 10 ccm $\frac{n}{1}$ H_2SO_4 (entsprechend Nr. 3 der III. Versuchsreihe) wurden auf 500 ccm ergänzt, sterilisiert und mit 5 g untergäriger Bierhefe versetzt.

Nr. 2. 70 g Rohrzucker + Extraktfiltrat + 1,5 g Weinsäure + 0,872 g K_2SO_4 (entsprechend der äquivalenten Menge in Nr. 1) wurden auf 500 ccm ergänzt, sterilisiert und ebenfalls mit 5 g derselben Bierhefe versetzt. Beide Proben wurden bei Zimmertemperatur der Gärung überlassen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 wiedergegeben.

Trotzdem somit im ersten Falle Schwefelsäure, im zweiten Falle Weinsäure verwendet wurde, ist die Gleichmäßigkeit der erzielten Resultate eine ganz auffallende. Zwischen Versuch III und IV konnte allerdings unmöglich die Gärungsintensität eine gleiche sein, nachdem sowohl die Gärtemperaturen als insbesondere die Verschiedenheit der

Bierhefenqualität eine solche ausschlossen. Das maßgebende Endresultat ist jedoch fast das gleiche und entspricht sehr annähernd der theoretischen Voraussetzung, daß das Zustandsverhältnis insbesondere zwischen den beiden letzten Parallelversuchen sehr annähernd dasselbe gewesen sein muß. Andernfalls würde die Gärungsintensität Differenzen aufgewiesen haben, wie sie aus den Versuchsreihen II und III klar zutage treten. Die bei Versuch Nr. 2 (Weinsäure + K_2SO_4) hervortretende günstigere Kohlensäure- und Alkoholzahl ist gegenüber Nr. 1 viel zu unbedeutend, als daß dieselbe nicht innerhalb der zulässigen Fehlergrenze liegend zu betrachten wäre. Doch ist es immerhin möglich, daß die Zustandsverhältnisse bei Nr. 1 und Nr. 2 sich nur annähernd aber nicht vollständig decken.

Tabelle 5.

Gewichtsabnahme in g CO_2.

	Nr. 1 Weinstein + H_2SO_4 4 ccm Azidität	Nr. 2 Weinsäure + K_2SO_4 4 ccm Azidität
1. Tag	0,07	0,06
2. „	5,65	6,80
3. „	14,00	14,50
4. „	8,30	8,30
5. „	4,00	3,40
6. „	1,60	1,10
7. „	0,85	0,45
Summa	34,47	34,61
Alkohol . . .	43,01 Vol. %	43,56 Vol. %
Ausbeute . . .	61,44 Vol. %	62,23 Vol. %

Eine Wiederholung und Erweiterung dieser, wie mir bewußt, ergänzungsbedürftigen Versuche wäre vom erkenntnistheoretischen Standpunkte umso wünschenswerter, als die angewendete analytische und insbesondere biologische Methode zur Erforschung der Zustandsverhältnisse von Salzlösungen einer erweiterten Anwendung fähig scheint. Im vorliegenden Falle erwies sich die Hefenzelle als scharfer Maßfaktor der geprüften Gleichgewichtsverhältnisse.

Aber auch vom praktischen Standpunkte sind die Ergebnisse der Versuche nicht ohne Interesse. Wie schon die Tabelle 1 beweist, ist es kaum zu erwarten, daß eine mit Schwefelsäure gesäuerte Maische

die gesamte Säure im gebundenen Zustande enthalten kann, während andererseits durch die Bildung saurer Salze, selbst bei stärkerem Säurezusatze, sofern derselbe nicht die durch das Bindungsvermögen der basischen Bestandteile gezogenen Grenzen weit überschreitet, die Gefahr einer schädlichen Wirkung der Schwefelsäure vermieden wird. Auch der variable Gehalt der Maische an alkalischen Erden, zum Teil auch aus dem Wasser zum Teil aus den erdigen Verunreinigungen herrührend, wird das Maß der freiwirkenden Schwefelsäure beeinflussen.

Zweifellos wird, wie aus Tabelle II hervorgeht, die geringste Überschreitung der zulässigen Schwefelsäuremenge eine sofortige Verlangsamung der Gärung bewirken und die Gefahr erkennen lassen. Sank doch bereits bei 0,0245 % freier Schwefelsäure (0,1 ° Delbrück) die Gärungsintensität am ersten Tage um fast die Hälfte. Diese geringe Säuremenge kann aber unmöglich eine Schädigung der Schlempe für Mastzwecke oder eine Gefahr für die Apparatur herbeiführen.

Zur Prüfung der tatsächlichen Bestätigung der auf synthetischem Wege gewonnenen Ergebnisse wurde eine, durch den Transport allerdings bereits in Gärung befindliche Maismaische mit aufsteigenden Mengen $^1/_2$ N. H_2SO_4 versetzt, mit Seesand getrocknet und mit Alkohol von 96 $^1/_2$ % extrahiert. Die Lösung wurde mit etwas Wasser versetzt, der Alkohol verdunstet, nochmals filtriert und die Schwefelsäure in der salzsauren Lösung mit $BaCl_2$ gefällt.

Die Grenze für den Säurezusatz betrug gemäß der Bauerschen Tabelle 3 ccm N. H_2SO_4 p. 100 ccm.

Das Ergebnis war folgendes:

		mg H_2SO_4	Gewogenes $BaSO_4$	Somit freie Säure	% der zugesetzten Säure
100 ccm Maischfiltrat	+ 2 ccm $^n/_2$ H_2SO_4	= 49	— 2 mg	= 0,8 mg	= 1,6 %
100 „ „	+ 4 „ „ „	= 98	— 3 „	= 1,2 „	= 1,22 „
100 „ „	+ 6 „ „ „	= 137	— 6 „	= 2,5 „	= 1,82 „
100 „ „	+ 8 „ „ „	= 196	— 7 „	= 2,9 „	= 1,47 „

Die Menge der freien Säure ist also so gering, daß sie praktisch gar nicht in Betracht kommt.

Dieser vorläufige Versuch, der wegen Mangel an Material und anderweitiger Inanspruchnahme bisher nicht ergänzt werden konnte und ebenfalls auf Kartoffelmaischen zu erstrecken wäre, möge nur als vorläufiges Ausführungsbeispiel Erwähnung gefunden haben.

Vorläufige Mitteilung über das Verhalten von Hefen und Schimmelpilzen zu Natriumthiosulfat.

Von **Alexander Kossowicz** und **Walter Loew.**

Die von uns untersuchten Hefen: Saccharomyces ellipsoideus I H., Sacch. cerevisiae I H., Sacch. apiculatus, Weinhefe Johannisberg II, Hefe Rasse XII und Schizosaccharomyces mellacei vermögen Thiosulfat unter Schwefelwasserstoffbildung als Schwefelquelle zu benutzen. Schimmelpilze assimilieren ebenfalls Thiosulfat, verhalten sich aber sonst zu Thiosulfat recht verschieden. Botrytis Bassiana, Cladosporium herbarum, Penicillium brevicaule, Aspergillus glaucus, Isaria farinosa und Fusisporium assimilieren Natriumthiosulfat direkt ohne Bildung von Schwefelwasserstoff, von Schwefelsäure und ohne Schwefelablagerung; eine merkliche Oxydation von Thiosulfat zu Polythionat (Tetrathionat) tritt nicht ein. Mucor γ Boidin entwickelt in thiosulfathaltigen Nährlösungen Schwefelwasserstoff. Penicillium glaucum und Aspergillus niger bilden je nach den Versuchsbedingungen Polythionate oder Schwefelsäure und scheiden dann zugleich Schwefel in einzelnen Pilzfäden ab. In Nährlösungen mit 10 % Thiosulfat zeigten alle Schimmelpilze gute Entwicklung. Auch in Nährlösungen mit 40 % Natriumthiosulfat kamen alle untersuchten Schimmelpilze, außer Mucor Boidin, A. glaucus und A. niger, zu einer guten Entwicklung und Fruktifikation.

Die Verwendung von Milchsäure und Milchsäurebakterien bei der Gurkensäuerung.

Von **Alexander Kossowicz.**

Im Anschlusse an meine Untersuchungen[1]) über das Weichwerden, die Schaumgärung der eingesäuerten Gurken und die Laboratoriumsversuche über die Anwendung von Milchsäurebakterien-Reinzuchten zur Gurkensäuerung wurden unter meiner Leitung auch umfangreichere Ver-

[1]) A. Kossowicz, Zeitschr. f. d. landw. Versuchswesen in Österreich, Bd. 11, 1908, S. 894, Bd. 12, 1909, S. 757 und Einführung in die Mykologie der Nahrungsmittelgewerbe, Berlin 1911, S. 96.

suche über diese Verwendung von Milchsäure und Milchsäurebakterien in der Praxis ausgeführt, die recht befriedigende Resultate ergaben.

Nebst der Beschaffenheit der Gurken selbst (hohle, bittere Gurken), sind für fehlerhafte Gärungen, z. B. das Weichwerden der Gurken, Mikroorganismen verantwortlich zu machen und zwar kommen nach Aderholds[1]) Untersuchungen hauptsächlich Bacterium coli, nach meinen Befunden Bakterien der Mesentericus-Gruppe und wohl auch Fluoreszenten in Betracht. Auf die Antibiose zwischen Coli- und Milchsäurebakterien hat erst kürzlich O. Gratz[2]) hingewiesen, dem zufolge die Vermehrung der Coli-Aerogenes-Stämme durch 0,3 % Milchsäure gewöhnlich unterdrückt wird, den entwicklungshemmenden Einfluß von Milchsäure auf Bakterien der Mesentericus-Gruppe (Kartoffelbakterien) hat Tillmans[3]) deutlich betont; bei einer Milchsäurekonzentration von 0,2 % kam die Entwicklung dieser Bakterien zum Stillstande. Untersuchungen, die von mir, zum Teil gemeinsam mit Herrn Militärunterintendanten L. v. Gröller, ausgeführt wurden, ergaben, daß Bacillus mesentericus vulgatus, B. mesentericus fuscus, B. mesentericus ruber und B. mesentericus niger in 0,2 % Milchsäure enthaltenden mineralischen Asparaginzuckerlösungen und in Gurkensaft mit gleichem Milchsäuregehalt (Versuchsdauer 30 Tage, Versuchstemperatur 15—20° C) eine sehr langsame und schwache Entwicklung zeigten, in rein mineralischen Zuckerlösungen gar nicht zu einer merklichen Entwicklung kamen, und bei 0,3 % Milchsäure auch in den zuerst genannten Nährböden ihre Entwicklung einstellten. Diese Konzentration wirkt auch auf Fluoreszenten und andere Bakterien stark entwicklungshemmend.

Bei Gurkensäuerungen im großen wird schon lange eine Art Impfmethode in Anwendung gebracht, indem man frischen Säuerungen den Saft gut gesäuerter Gurken zusetzt. Selbstverständlich hängt es hier ganz von nicht weiter zu beeinflussenden Faktoren, „vom Zufall“ ab, wie sich der weitere Konkurrenzkampf der Mikroorganismen gestaltet, der über die Güte der Säuerung entscheidet.

Soweit sie eine Verallgemeinerung erlauben, sollen die von mir bezüglich der Anwendung von Milchsäure und Milchsäurebakterien bei der Gurkensäuerung gemachten Erfahrungen hier mitgeteilt werden.

1. Ein Zusatz von Milchsäure zu dem für die Säuerung bestimmten, abgekochten Wasser vermag die Säuerung auch ohne Verwendung von

[1]) R. Aderhold, Landw. Jahrb., Bd. 28, 1899, S. 127; Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 5, 1899, S. 513; Lafars Handbuch der technischen Mykologie, Bd. 2, S. 328.

[2]) O. Gratz, Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, Bd. I, 1912, S. 256.

[3]) J. Tillmans, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrgs.- u. Genußmittel, Bd. 5, 1902, S. 737.

Milchsäurebakterien-Reinzuchten günstig zu beeinflussen und zwar soll das Wasser auf einen Gehalt von 0,4—0,5 % Milchsäure gebracht werden, der dann durch den Gurkensaft wesentlich heruntergedrückt wird.

2. Zur Gurkensäuerung eignen sich nicht bloß Reinzuchten von aus Gurkensäuerungen isolierten Milchsäurebakterien, sondern auch solche aus anderen Gemüsesäuerungen (z. B. Kraut, Zwiebeln usw.) und aus Molkereiprodukten. Es ergeben sich wohl Unterschiede insbesondere bezüglich des Säuerungsgrades, doch sind sie von keiner wesentlichen Bedeutung und viel mehr von der Menge der eingeführten Reinzucht und dem Mikroorganismengehalt (in quantitativer und qualitativer Beziehung) der Gurken, als von der gewählten Milchsäurebakterie abhängig; die geschmacklichen Unterschiede, auf die es hauptsächlich ankommen würde, sind sehr veränderlich und überhaupt sehr schwer zu bestimmen.

3. Die Milchsäurebakterien müssen vor ihrer Verwendung meist einer Vorkultur unterworfen werden, zu welchem Zwecke die Nährlösung mit steigenden Zusätzen von sterilem Gurkensaft versetzt wird; so bringt man die Bakterie z. B. in Molke, Schotten oder dergleichen mit $^1/_3$ Gurkensaft, dann mit $^1/_2$ Gurkensaft, zuletzt in reinen Gurkensaft. Bei manchen Bakterien, z. B. Bact. Güntheri sind eine weitere Abstufung und häufigere Überimpfung erforderlich.

4. Bei der Wahl der Milchsäurebakterie ist darauf Rücksicht zu nehmen, ob die Säuerung in der Wärme oder, wie das von mir empfohlen wurde, in der Kälte (bei niederen Temperaturen, unter + 15° C) ausgeführt werden soll.

5. Die Bakterienreinzucht soll dem zur Säuerung bestimmten Wasser zugesetzt werden, weil in diesem Falle am besten gleich anfangs eine entsprechende Verteilung der Mikroben in dem zu säuernden Material stattfindet.

6. Es ist notwendig, gleich zu Beginn der Säuerung eine größere Menge der Milchsäurebakterie einzuführen; man kann ungefähr 5 ccm einer gut entwickelten Zucht in Gurkensaft auf ca. 15—20 kg Gurken rechnen.

7. Auch bei Anwendung von Milchsäurebakterien-Reinzuchten bei der Gurkensäuerung ist ein Zusatz von Milchsäure zu empfehlen (ca. 0,1 %), der aber bei Einführung einer größeren Menge der Reinzuchtbakterie entfallen kann.

8. Mit Mischzuchten, die aus Weinhefe und Milchsäurebakterien bestanden, wurden manchmal recht gute, im Geschmack und Geruch allerdings meist etwas abweichende Gurkensäuerungen erzielt. Werden beide Organismen getrennt, zu verschiedenen Zeiten, eingebracht, so soll der Zusatz von Milchsäurebakterien vorausgehen.